Aus dem Medizinischen Zentrum für Kinderheilkunde
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. H.W. Seyberth
Abteilung für allgemeine Pädiatrie
Leiter: Prof. Dr. med. H.W. Seyberth

---

# Mutationsanalysen bei hereditären Salzverlusttubulopathien

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Henning Ott
aus Marburg

Marburg, 2004

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am: 17.06.2004
gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs

| | |
|---|---|
| Dekan: | Prof. Dr. med. P. Maisch |
| Referent: | Prof. Dr. med. H.W. Seyberth |
| Correferent: | PD Dr. rer. nat. J. Kunz |

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen ..... VI

1 Einleitung ..... 1
1.1 Einführung ..... 1
1.2 Das Bartter-Syndrom (BS) ..... 1
1.2.1 Übersicht ..... 1
1.2.2 Phänotypische Varianten des Bartter-Syndroms ..... 2
1.2.2.1 Hyperprostaglandin-E-Syndrom (HPS) ..... 2
1.2.2.2 Klassisches Bartter-Syndrom (cBS) ..... 3
1.2.2.3 Gitelman-Syndrom (GS) ..... 4
1.2.2.4 Bartter-Syndrom mit Taubheit (BSND) ..... 5
1.2.3 Pathogenese ..... 5
1.2.3.1 Pathogenese des Hyperprostaglandin-E-Syndroms ..... 6
1.2.3.2 Pathogenese des klassischen Bartter-Syndroms ..... 9
1.2.3.3 Pathogenese des Gitelman-Syndroms ..... 10
1.2.3.4 Pathogenese des BSND ..... 11
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit ..... 12
1.3.1 Mutationsanalyse ..... 12
1.3.1.1 Vorgehensweise ..... 12
1.3.1.2 Das ROMK-Gen (*KCNJ1*) ..... 13
1.3.1.3 Das ClC-Kb-Gen (*ClC-Kb*) ..... 15
1.3.2 Zusammenfassende Fragestellung ..... 16
2 Material und Methoden ..... 17
2.1 Patienten ..... 17
2.2 Allgemeine Materialien ..... 18
2.2.1 Geräte und Hilfsmittel ..... 18
2.2.2 Chemikalien und Reagenzien ..... 19
2.3 DNA-Gewinnung ..... 20

2.3.1 Material ....................................................................................20
2.3.1.1 Geräte....................................................................................20
2.3.1.2 Chemikalien....................................................................................20
2.3.2 DNA-Isolierung aus Vollblut ....................................................................................21
2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ....................................................................................22
2.4.1 Beschreibung ....................................................................................22
2.4.2 Material ....................................................................................23
2.4.2.1 Geräte....................................................................................23
2.4.2.2 Chemikalien....................................................................................23
2.4.3 Durchführung ....................................................................................23
2.5 Gelelektrophorese....................................................................................26
2.5.1 Beschreibung ....................................................................................26
2.5.2 Material ....................................................................................27
2.5.2.1 Geräte....................................................................................27
2.5.2.2 Materialien ....................................................................................27
2.5.3 Durchführung ....................................................................................27
2.6 SSCP-Analyse ....................................................................................28
2.6.1 Beschreibung ....................................................................................28
2.6.2 Material ....................................................................................30
2.6.2.1 Geräte....................................................................................30
2.6.2.2 Chemikalien....................................................................................30
2.6.3 Durchführung ....................................................................................31
2.6.4 Auswertung....................................................................................32
2.7 DNA-Sequenzierung ....................................................................................34
2.7.1 Beschreibung ....................................................................................34
2.7.2 Material ....................................................................................37
2.7.2.1 Geräte....................................................................................37
2.7.2.2 Chemikalien....................................................................................37
2.7.3 Durchführung ....................................................................................38
2.7.4 Auswertung....................................................................................40
3 Ergebnisse ....................................................................................42
3.1 Mutationsanalyse ....................................................................................42
3.1.1 Untersuchung des ROMK-Gens (*KCNJ1*)....................................................................................42
3.1.1.1 Allgemeines ....................................................................................42
3.1.1.2 Ergebnisse der Mutationssuche ....................................................................................43

3.1.2 Untersuchung des ClC-Kb-Gens (*ClC-Kb*)....................................68
3.1.2.1 Allgemeines ....................................................................................................68
3.1.2.2 Ergebnisse der Mutationssuche ..........................................................................70
4 Diskussion.................................................................85
4.1 Das ROMK-Gen (KCNJ1) ...............................................85
4.1.1 Mutationen im *KCNJ1* ......................................................................86
4.2 Das ClC-Kb-Gen (*CLCNKB*) ..............................................94
4.2.1 Mutationen im *ClC-Kb*......................................................................95
4.3 Pathophysiologie.................................................................101
4.4 Schlussbetrachtung............................................................102
5 Zusammenfassung...................................................105
6 Literaturverzeichnis ...................................................107
7 Anhang...............................................................119
7.1 Fragebogen...................................................................119
7.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer ...............................122
7.3 Danksagung ..................................................................123

# Abkürzungen

Angaben in [...] sind Maßeinheiten

Ala ........................................................................................................ Alanin
APS .................................................................................... Ammoniumpersulfat
Arg ........................................................................................................ Arginin
Asn ................................................................................................. Asparagin
Asp ........................................................................................ Asparaginsäure
ATP ................................................................................. Adenosintriphosphat
[bp] ................................................................................................. Basenpaare
BS ........................................................................................... Bartter-Syndrom
BSC ............................................................ Bumetanid-sensitiver Kotransporter
cAMP ........................................................... zyklisches Adenosinmonophosphat
cBS ........................................................................... klassisches Bartter Syndrom
cDNA .................................................................. copy-Desoxyribonukleinsäure
[cM] ............................................................................................... centiMorgan
Cy5 ................................................................................................... Cyanin-5
Cys ........................................................................................................ Cystein
DNA ............................................................................. Desoxyribonukleinsäure
dNTP ..................................................................... Desoxynukleosidtriphosphat
ddNTP ................................................................. Didesoxynukleosidtriphosphat
DEPC .......................................................................... Diethylpyrocarbonat
EDTA ................................................................ Ethylendiamintetraessigsäure
E ......................................................................................................... Extinktion
FISH ........................................................... Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
Gln ..................................................................................................... Glutamin
Glu ........................................................................................... Glutaminsäure
Gly ......................................................................................................... Glycin
GS ....................................................................................... Gitelman-Syndrom
His ........................................................................................................ Histidin

HPS ..... Hyperprostaglandin-E-Syndrom
Ile ..... Isoleucin
[kb] ..... Kilobasenpaare
Kir ..... $K^+$ inward rectifier
Leu ..... Leucin
Lys ..... Lysin
Met ..... Methionin
PCR ..... Polymerasekettenreaktion
$PGE_2$ ..... Prostaglandin $E_2$
Phe ..... Phenylalanin
PKA ..... Proteinkinase A
PKC ..... Proteinkinase C
Pro ..... Prolin
ROMK ..... renal outer medullary $K^+$
Ser ..... Serin
SSCP ..... Single-strand-conformation-polymorphism
SSW ..... Schwangerschaftswoche
Thr ..... Threonin
Trp ..... Tryptophan
TSC ..... Thiazid-sensitiver Kotransporter
Tyr ..... Tyrosin
[U] ..... Unit
[Upm] ..... Umdrehungen pro Minute
Val ..... Valin
v/v ..... Volumen pro Volumen
w/v ..... Gewicht pro Volumen

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung

Verschiedene erbliche Erkrankungen des Tubulusapparates der Niere beeinflussen den renalen Ionenhaushalt in der Weise, dass sie sich häufig durch pathologische Elektrolytverschiebungen, Salzverluste oder Blutdruckveränderungen manifestieren. Mit Hilfe der Genanalyse gelang es zum einen, Genmutationen zu identifizieren, die die tubulären Ionentransporter in ihrer Funktion beeinflussen, und zum anderen verschiedene erbliche Syndrome aufzuklären [LÓPEZ-NIETO u. BRENNER 1997].
Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten molekulargenetischen Untersuchungen befassen sich mit einer Gruppe von hereditären hypokaliämischen Tubulopathien, deren uneinheitliches klinisches Bild bislang unter dem Begriff Bartter-Syndrom zusammengefasst wurde [KÁROLYI et al. 1998].

## 1.2 Das Bartter-Syndrom (BS)

### 1.2.1 Übersicht

Der Begriff Bartter-Syndrom stellt den historisch bedingten Sammelbegriff für einige hereditäre Tubulopathien dar, denen eine chronische hypokaliämische metabolische Alkalose gemein ist. 1957 waren es Rosenbaum und Hughes, die von einem Säugling mit einer therapieresistenten hypokaliämischen Alkalose, einem renalen Konzentrationsdefekt, einer ausgeprägten Gedeihstörung, sporadischen Diarrhöen und einer Dehydratation berichteten [ROSENBAUM U: HUGHES 1957]. Im Jahre 1962 berichtete Frederic C. Bartter von zwei Patienten, einem Kind und einem Erwachsenen, die den oben genannten Symptomkomplex aufwiesen. Zusätzlich zeigten beide einen normotonen

hyperreninämischen Hyperaldosteronismus und eine histologisch erkennbare Hyperplasie des juxtaglomerulären Apparates der Niere. Die Veröffentlichungen der folgenden Jahre zeigten sowohl in Bezug auf die Klinik als auch auf die Pathogenese eine deutliche Heterogenität dieses Krankheitsbildes [GITELMAN et al. 1966], [FANCONI et al. 1971], [SEYBERTH et al. 1985], [McCREDIE 1996]. Daher wird heutzutage das Bartter-Syndrom in phänotypisch unterschiedliche Varianten aufgeteilt: 1. Die antenatale hyperkalziurische Form oder das *Hyperprostaglandin-E-Syndrom* (HPS), 2. das *klassische Bartter-Syndrom* (cBS), 3. die hypokalziurisch-hypomagnesiämische Variante oder *Gitelman-Syndrom* (GS) [SCHWARTZ u. ALON 1996], [SEYBERTH et al. 1998] und 4. die antenatale hyperkalziurische Form (HPS) mit Taubheit (BSND-Bartter-syndrome with sensorineuronal deafness) [LANDAU et al. 1995], [JECK et al. 2001a].
Bezüglich des Erbganges geht man aufgrund der familiären Häufung, der ausgeglichenen Geschlechterverteilung und des vermehrten Auftretens bei blutsverwandten (konsanguinen) Familien von einer autosomal-rezessiven Vererbung aus. Bezüglich der Ätiologie konnten erst mit Hilfe molekularbiologischer Methoden einige Aussagen getroffen werden [SIMON et al. 1996c]. Die bis dahin durchgeführten klinischen Studien und physiologischen Untersuchungen konnten der Komplexität dieses Krankheitsbildes nicht ausreichend gerecht werden [CLIVE 1995].
Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen einen Beitrag zur noch ausstehenden endgültigen Klärung der Korrelation von Genotyp und Phänotyp leisten.

### 1.2.2 Phänotypische Varianten des Bartter-Syndroms

#### 1.2.2.1 Hyperprostaglandin-E-Syndrom (HPS)

Das Hyperprostaglandin-E-Syndrom (auch antenatales Bartter-Syndrom genannt) manifestiert sich bereits in utero und zeigt einen fulminanten Verlauf. Erstmals 1972 von Fanconi et al. beschrieben, ging man noch nicht auf die Rolle des Prostaglandins $E_2$ ($PGE_2$) ein, sondern beschrieb es lediglich als eine

antenatale Form des Bartter-Syndroms. Neben der hypokaliämischen metabolischen Alkalose und dem normotonen hyperreninämischen Hyperaldosteronismus zeigen die betroffenen Kinder u.a. eine Hyperkalziurie mit Nephrokalzinose. Ferner findet man eine Hypo- bzw. Isosthenurie sowie eine ausgeprägte Steigerung der renalen $PGE_2$-Synthese [SEYBERTH et al. 1985]. Pränatal manifestiert sich das Hyper-$PGE_2$-Syndrom durch die fetale Polyurie mit konsekutivem Polyhydramnion und der sich daraus ergebenden erhöhten Gefahr der Frühgeburtlichkeit meist zwischen der 28. und 34. Schwangerschaftswoche [JECK et al. 2001a]. Die betroffenen Kinder zeigen neben den oben genannten Symptomen schwere Salz- und Wasserverluste, eine Gedeihstörung sowie eine Osteopenie [McCREDIE et al. 1974], [SHOEMAKER et al. 1993], [LEONHARDT et al. 1992]. Weitere häufige Symptome sind Übelkeit, Erbrechen und rekurrentes Fieber [CLIVE 1995], [SEYBERTH et al. 1998], [JECK et al. 2001a], die auf die gesteigerte $PGE_2$-Synthese zurückzuführen sind. Schätzungen bezüglich der Prävalenz belaufen sich auf ca. 1:50000 [SEYBERTH et al. 1994].

Die Rolle des Prostaglandins $E_2$ bei dieser phänotypischen Variante wird besonders bei der Therapie untermauert, da die medikamentöse Hemmung der Zyklooxygenase, z.B. mit Indometacin, und somit der $PGE_2$-Synthese einen erfolgversprechenden Therapieansatz darstellt [SEYBERTH et al. 1987], [SEIDEL et al. 1995], der inzwischen als Therapie der Wahl für das HPS etabliert werden konnte [MACKIE et al. 1996], [SEYBERTH et al. 1998]. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass die pränatale Gabe von Indometacin das Voranschreiten des Polyhydramnions verhindern kann und somit auch zur Prävention einer extremen Frühgeburtlichkeit beiträgt [JECK et al. 2001a].

#### 1.2.2.2 Klassisches Bartter-Syndrom (cBS)

Beim klassischen Bartter-Syndrom handelt es sich um die am wenigsten abgrenzbare Einheit des Bartter-Syndrom-Komplexes. Bei den betroffenen Kindern findet sich lediglich eine hypokaliämische Alkalose und der hyperreninämische Hyperaldosteronismus. Die Symptome entsprechen am ehesten denen der Originalbeschreibung durch Bartter [BARTTER et al. 1962].

Sowohl Hyperkalziurie, Nephrokalzinose, Polyhydramnion und Frühgeburtlichkeit als Einschlusskriterien für das HPS als auch Hypokalziurie und Hypomagnesiämie als Merkmale des Gitelman-Syndroms sind nicht vorhanden [SEYBERTH et al. 1987]. Daher wird die Diagnose des klassischen Bartter-Syndroms meist bei Fehlen der Symptome von HPS und GS gestellt.
Das klassische Bartter-Syndrom manifestiert entgegen dem HPS postpartal, meist innerhalb der ersten beiden Lebensjahre. Ein späteres Auftreten, wie es beim Gitelman-Syndrom der Fall ist, ist selten. Das Fehlen der oben beschriebenen Symptome und der Zeitpunkt der Manifestation grenzt das klassische Bartter-Syndrom vom HPS und Gitelman-Syndrom ab und rechtfertigt es somit, eine eigene phänotypische Variante als vorhanden anzunehmen.

#### 1.2.2.3 Gitelman-Syndrom (GS)

Im Jahre 1966 berichtete H.J. Gitelman über Patienten, die sich aufgrund ihrer Symptomkonstellation, wie hypokaliämischer Alkalose und dem hyperreninämischen Hyperaldosteronismus, dem Komplex des Bartter-Syndroms zuordnen ließen, zudem aber andere Merkmale besaßen, die zu keiner der oben genannten Varianten passten. So zeigten sie eine deutliche Hypomagnesiämie, die zusätzlich zur erhöhten Kalium- auch auf eine erhöhte Magnesiumausscheidung zurückzuführen ist. Im Gegensatz zum HPS fand sich bei diesen Kindern keine durch eine Hyperkalziurie bedingte Nephrokalzinose, sondern ganz im Gegenteil eine Hypokalziurie. Diese Besonderheiten ließen an eine eigene Entität denken [GITELMAN 1992]. Heutzutage sind es die durch die verminderte renale Kalziumausscheidung bedingte Hypokalziurie und die Hypomagnesiämie, die als Parameter für die Zuordnung zu diesem Krankheitsbild gelten [BETTINELLI et al. 1992]. Im Gegensatz zum HPS war die renale Konzentrationsfähigkeit nur leicht oder gar nicht eingeschränkt. Auch spezifische Untersuchungen des Urins zeigten in Bezug auf das Prostaglandin $E_2$ keine Auffälligkeiten [LÜTHY et al. 1995].
Das Gitelman-Syndrom ist auch als „mildere“ Form der vier Entitäten bekannt, da Patienten häufig erst im Rahmen von Routineuntersuchungen in der

späteren Jugend diagnostiziert werden. Die beschriebenen Symptome reichen von asymptomatisch über milde Symptome wie leichte Muskelkrämpfe und verfrühte Ermüdung bis hin zu schweren Manifestationen mit Tetanien, Paralyse und Rhabdomyolyse [CRUZ et al. 2001]. Schätzungen bezüglich der Prävalenz des Gitelman-Syndroms belaufen sich auf ca. 1:50000.

#### 1.2.2.4 Bartter-Syndrom mit Taubheit (BSND)

Diese vierte phänotypische Variante des Bartter-Syndrom-Komplexes wurde erstmalig 1995 von Landau et al. beschrieben. Die betroffenen Kinder werden meist pränatal bzw. in der frühen Kindheit diagnostiziert. Auch diese Patienten zeigen wie die mit einem Hyperprostaglandin-E-Syndrom das klinische Bild eines Polyhydramnions, einer hypokaliämischen Alkalose, einer transitorischen Hyper- bzw. einer Normokalziurie und die Unfähigkeit, den Urin zu konzentrieren. Allerdings fanden sich keine Hinweise auf eine Nephrokalzinose, wie es beim Hyperprostaglandin-E-Syndrom der Fall ist. Die Folge sind Polyurie und Gedeihstörungen. Zusätzlich findet sich bei allen Kindern dieser Entität eine Taubheit, deren Ursache ein Defekt im Corti-Organ ist [JECK et al. 2001a]. Die Mehrzahl der Kinder zeigt eine ausgeprägte Wachstumsretardierung sowie eine deutlich verzögerte Entwicklung motorischer Fähigkeiten. Ferner entwickelten einige der Patienten ein chronisches Nierenversagen. Im Gegensatz zu den Patienten mit HPS sprechen die Patienten dieser Entität kaum auf die Behandlung mit Indometacin an. Obgleich ein Großteil der Symptome denen des HPS entsprechen, lässt sich diese Variante dennoch eindeutig abgrenzen und stellt somit eine eigene Entität dar.

### 1.2.3 Pathogenese

Die deutliche Heterogenität dieses Krankheitsbildes erschwerten die Überlegungen bezüglich der Pathogenese. Die allen vier Entitäten gemeinsamen Salz- und Wasserverluste und die hypokaliämische Alkalose richteten das Augenmerk auf Störungen im Bereich der renalen Rückresorption

von Natrium und Chlorid [GILL JR. u. BARTTER 1978]. Der Vergleich des Elektrolytprofils der Patienten im Serum und Urin und das Wirkprofil von Diuretika, insbesondere Schleifendiuretika und Thiazide, zeigten deutliche Gemeinsamkeiten. So fand sich bei Patienten mit Gitelman-Syndrom ein ähnliches Elektrolytprofil, wie es bei dauerhaftem Gebrauch von Thiaziden beobachtet wird [SUTTON et al. 1992]. Daher war der Na-Cl-Kotransporter im Bereich des distalen Tubulus bei weiteren Untersuchungen dieser Patienten von besonderem Interesse. Bei Kindern mit einem Hyperprostaglandin-E-Syndrom zeigten sich Gemeinsamkeiten zwischen dem Elektrolytprofil und dem durch das Schleifendiuretikum Furosemid hervorgerufenen Effekt [KÖCKERLING et al. 1996]. In diesem Fall trat der Na-K-2Cl-Kotransporter des dicken aufsteigenden Teils der Henleschen-Schleife in das Blickfeld des Interesses und war somit Gegenstand molekulargenetischer Untersuchungen.
Eine Mutation im Bereich dieser Kanäle führt in vielen Fällen zu einer Konformationsänderung des Kanals mit einer daraus resultierenden Funktionsstörung. Erst die funktionelle Charakterisierung eines durch eine Mutation veränderten Kanals gibt Aufschluss über die Schwere der Fehlfunktion. So kann es einerseits zu einer Malfunktion und andererseits zu einem völligen Verlust der Transportfunktion kommen. Ob oder inwieweit dies Einfluss auf den Schweregrad und den Verlauf der Krankheit hat, bleibt zu klären.

#### 1.2.3.1 Pathogenese des Hyperprostaglandin-E-Syndroms

Wie oben beschrieben, richteten sich die molekulargenetischen Untersuchungen zunächst vornehmlich auf den Na-K-2Cl-Kotransporter, der von den Schleifendiurektika beeinflusst wird. Die Grundlage für die genetischen Untersuchungen wurde durch die molekulare Charakterisierung dieses Kotransporters gelegt [GAMBA et al. 1994], [PAYNE u. FORBUSH III 1994]. Durch die Charakterisierung des homologen humanen Kotransporters (auch Bumetanid-sensibler Kotransporter: BSC oder NKCC2), dessen Klonierung [XU et al. 1994] und Lokalisierung auf Chromosom 15q15-15q21 [PAYNE et al. 1995] war dieses Gen für Mutationsanalysen zugänglich. Die Linkage-Analysen

bei den betroffenen Familien zeigten eine signifikante Kopplung der entsprechenden Region und mit Hilfe der daraufhin durchgeführten Mutationsanalysen konnten einige Mutationen im Bereich des NKCC2 beschrieben werden [SIMON et al. 1996b]. Allerdings gab es auch Familien, bei denen der NKCC2 als mögliche Ursache ausgeschlossen wurde, und man musste daher davon ausgehen, dass es sich zum einen bei dem HPS um eine genetisch heterogene Erkrankung handelt, d.h., dass es mindestens einen weiteren Genlocus geben musste, dessen Veränderung ebenfalls zu diesem Phänotyp führt.

Betrachtet man die Physiologie der Henleschen-Schleife, dann zeigt sich, dass die Natrium-Kalium-Rückresorption nicht allein von dem oben beschriebenen

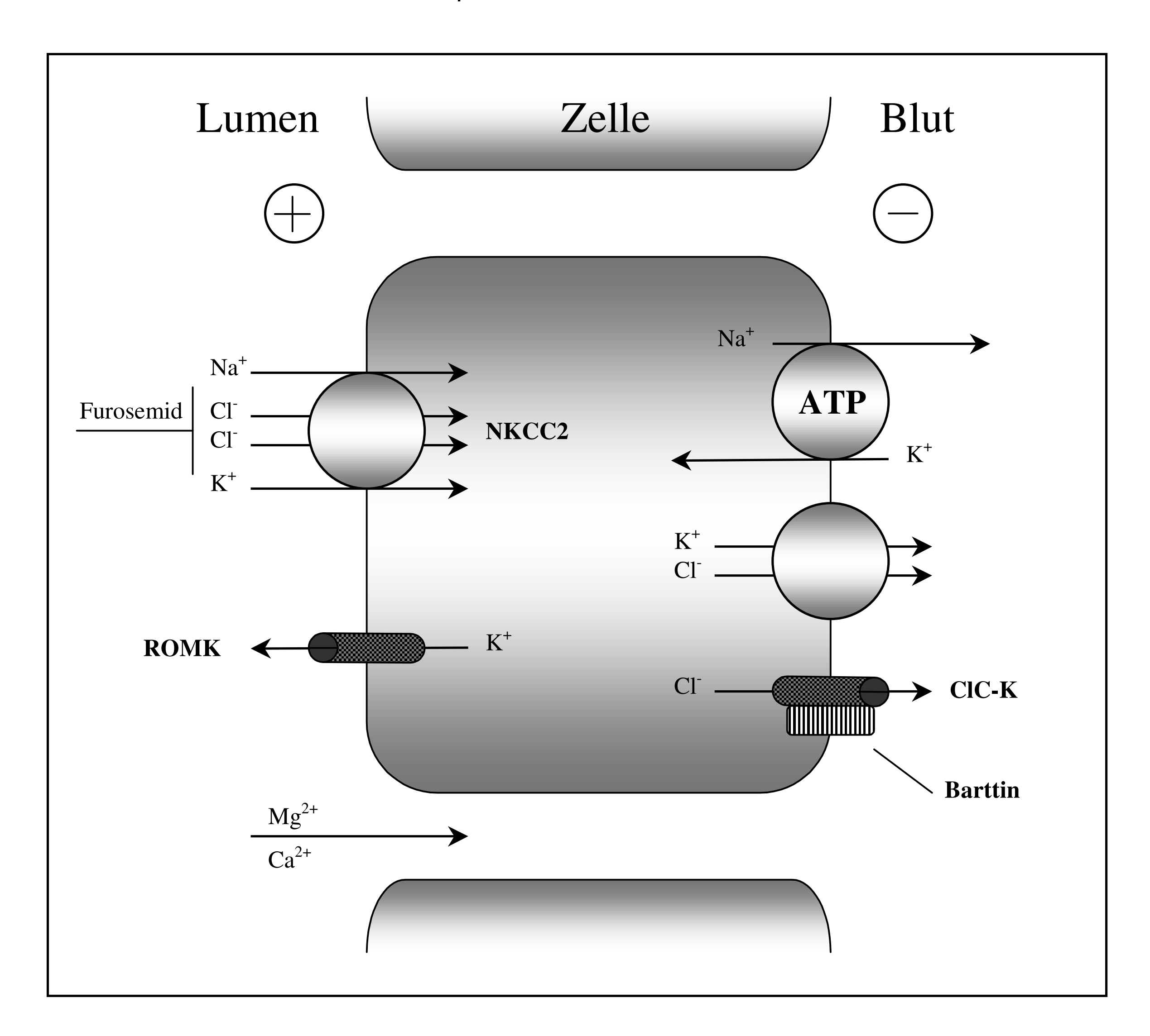



**Abbildung 1.1** Schema der Natrium- und Chlorid-Rückresorption im dicken aufsteigenden Teil der Henleschen-Schleife; Pfeil = Diffusion; Kreis = carriervermittelter Transport; Kreis mit ATP = $Na^+/K^+$-ATPase. Schleifendiuretika (Furosemid, Bumetanid u.a.) hemmen den $Na^+$-$K^+$-$2Cl^-$-Transporter.

NKCC2-Kotransporter abhängig ist, sondern, wie die Abbildung 1.1 zeigt, verschiedene Ionenkanäle in der Zelle an verschiedenen Positionen gleichgerichtet sind [GREGER 1996]. Durch die Abhängigkeit der Kanäle zueinander ist es möglich, dass Störungen in diesem Bereich ebenfalls zum Phänotyp des HPS führen. So arbeiten hinsichtlich der NaCl-Rückresorption ein apikal gelegener Kaliumkanal (ROMK), ein basolateral gelegener Kalium-Chlorid-Kotransporter, ein ebenfalls baso-lateral gelegener Chloridkanal und die basale Natrium-Kalium-ATPase zusammen. Diese Natrium-Kalium-ATPase erzeugt einen steilen elektrochemischen Gradienten für Natrium von extra- nach intrazellulär. Angetrieben durch diesen Gradienten fördert der apikale NKCC2-Kotransporter die Aufnahme von Natrium, Kalium und Chlorid in die Tubuluszelle. Essentiell für das Funktionieren dieses Kotransporters ist ein ständiges Kalium-Recycling in das Tubuluslumen durch ROMK. Das Chlorid verlässt die Zelle über basale Chloridkanäle. Die Chloridresorption führt zum Aufbau einer elektrischen Spannung über dem Epithel, welches wiederum die parazelluläre Kalzium- und Magnesiumresorption fördert.

Da der ATP-abhängige Kaliumkanal ROMK durch sein Kalium-Recycling die Funktion des NKCC2 unmittelbar aufrechterhält [GIEBISCH u. WANG 1996], war er für weitere molekulargenetische Untersuchungen von besonderem Interesse. Die vorliegenden Ergebnisse der cDNA-Klonierung [HO et al. 1993], [SHUCK et al. 1994] und der genomischen Lokalisierung des ROMK-Gens (*KCNJ1*) auf Chromosom 11q24-11q25 mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) [KRISHNAN et al. 1995] ermöglichten die Kopplungsanalyse bei Familien, die für den NKCC2 nicht gekoppelt hatten [ICSBS 1997]. Das Ergebnis dieser Untersuchung sprach für die Kopplung in diesem Bereich und wurde durch die sich anschließende Mutationsanalyse, bei der eine Reihe von Mutationen nachgewiesen werden konnten [SIMON et al. 1996], [ICSBS 1997], bestätigt. Mittlerweile ist eine Vielzahl von Mutationen in diesem Kanal bekannt. Die Expression der durch die Mutationen veränderten Kanäle in Xenopus-Oocyten zeigt eine signifikante Beeinträchtigung der Kanalfunktion [DERST et al. 1997].

#### 1.2.3.2 Pathogenese des klassischen Bartter-Syndroms

Wie in Abschnitt 1.2.2.2 beschrieben, ist das klassische Bartter-Syndrom das am wenigsten abgrenzbare Krankheitsbild. Durch Kopplungsanalysen im Bereich der bisher bekannten Kandidatengene wurde die Zugehörigkeit verschiedener Patienten mit hypokaliämischer metabolischer Alkalose zu einer der anderen Entitäten ausgeschlossen. In den Mittelpunkt des Interesses rückte daher der basolateral gelegene Chloridkanal ClC-Kb im dicken aufsteigenden Teil der Henleschen Schleife. Der Kanal besteht aus 687 Aminosäuren [KIEFERLE et al. 1994], [BRANDT u. JENTSCH 1995] und konnte auf Chromosom 1p36 lokalisiert werden [SAITO-OHARA et al. 1996]. Kopplungsanalysen unterstrichen die Bedeutung dieses Kanals in Bezug auf die Pathogenese des klassischen Bartter Syndroms [SIMON et al. 1997]. In der Folge konnten verschiedene Mutationen beschrieben werden, wobei es sich um Deletionen, Nonsense- und Missense-Mutationen handelte [SIMON et al. 1997], [JECK et al. 2001a].

Der ClC-Kb spielt eine wichtige Rolle bei der Chloridreabsorption. Während im Bereich der apikalen Membran die physiologische Kopplung des NKCC2 und ROMK einen Anteil von 50% des NaCl-Transportes ausmacht, gibt es im Bereich der basolateralen Membran weitaus mehr Wege der Chloridreabsorption. Neben dem ClC-Kb sind auch der KCl-Kotransporter und andere Chloridkanäle wie der CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator) und der ClC-5 an diesem Prozess beteiligt. Diese verschiedenen Möglichkeiten der basolateralen Chloridreabsorption im dicken aufsteigenden Teil der Henleschen Schleife sind möglicherweise für die unterschiedlich starke Ausprägung des Salzverlustes und die anderer klinischer Symptome im Falle eines Defektes im Bereich des ClC-Kb verantwortlich [JECK et al. 2001a].

Es wird ferner vermutet, dass die Stärke der Beeinträchtigung des NaCl-Transportes im dicken aufsteigenden Teil der Henleschen Schleife und die damit verbundene Reduktion des lumenpositiven Potentials einen direkten Einfluss auf die Höhe der Kalzium- und Magnesiumausscheidung mit dem Urin hat.

1.2.3.3 Pathogenese des Gitelman-Syndroms

Überlegungen zur Entstehung dieses Phänotyps legen eine Veränderung der Funktion im Bereich des distalen Tubulus nahe [PUSCHETT et al. 1988], da die betroffenen Patienten ähnliche Elektrolytveränderungen aufweisen, wie sie beim dauerhaften Gebrauch von Thiazid-Diuretika beobachtet werden. Die ionalen Transportverhältnisse sind in Abbildung 1.2 dargestellt.
Nach der Charakterisierung des Natrium-Chlorid-Kotransporters (NCCT oder Thiazid-sensibler-Kotransporter) im distalen Tubulus [GAMBA et al. 1993] und

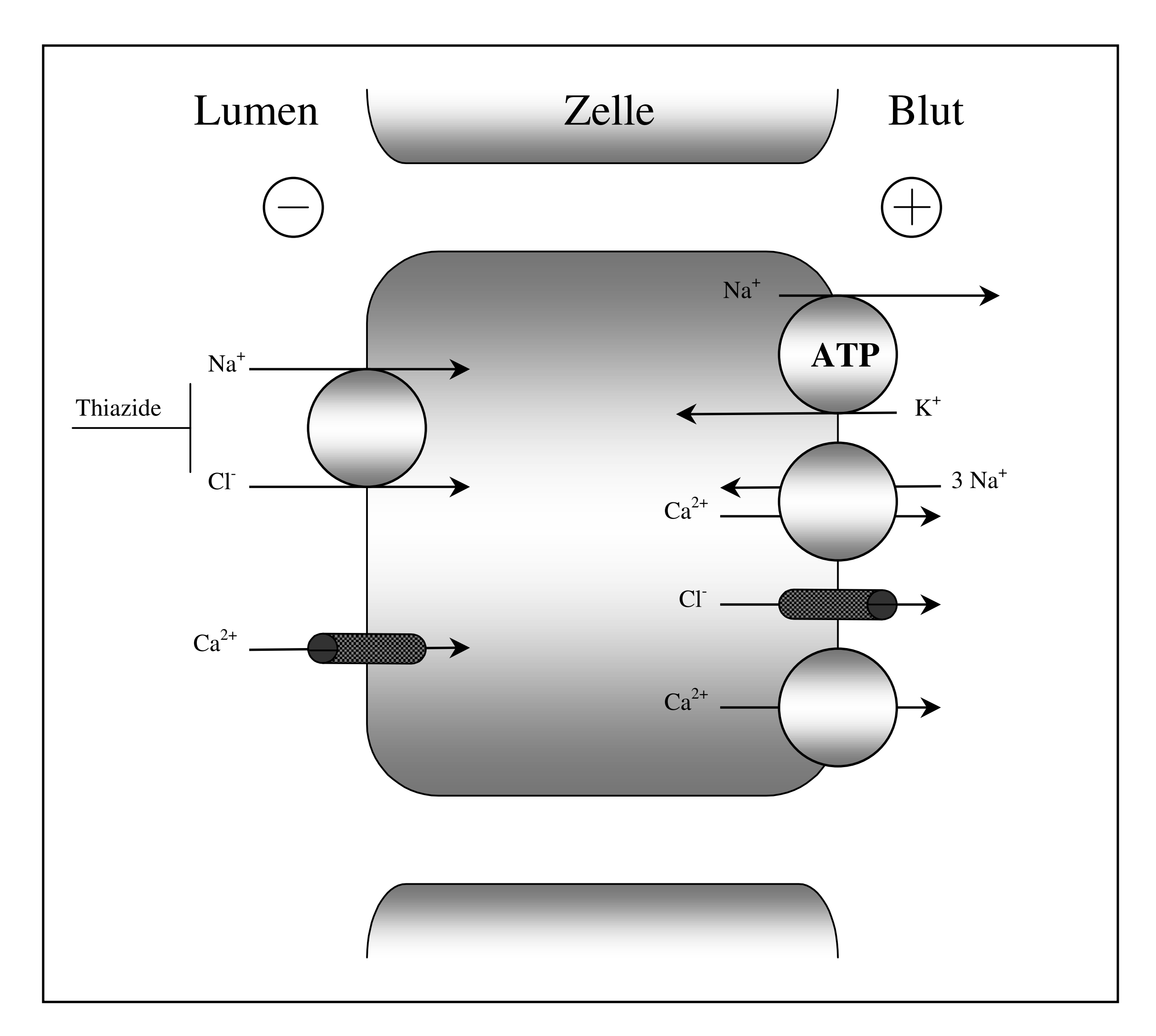



**Abbildung 1.2** Schema der Natrium- und Chlorid-Rückresorption im distalen Konvolut; Pfeil = Diffusion; Kreis = carriervermittelter Transport; Kreis mit ATP = $Na^+/K^+$-ATPase. Thiazide (z.B. Hydrochlorothiazid) hemmen den $Na^+Cl^-$-Transporter.

der Klonierung und Lokalisierung des Gens *SLC12A3* auf Chromosom 16p13 mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung waren die Grundlagen für weitere

Mutationsanalysen geschaffen [MASTROIANNI et al. 1996a]. Die positiven Kopplungsanalysen aller betroffenen Familien [KÁROLYI et al. 1996] bestätigten die Vermutung, dass es sich beim *SLC12A3* um ein Kandidatengen handelt. Die Eindeutigkeit des Ergebnisses lässt auf eine genetisch homogene Erkrankung schließen. Innerhalb kurzer Zeit wurde eine Vielzahl von Mutationen entdeckt, die das gesamte Spektrum der möglichen Abberationen umfassen [SIMON et al. 1996b], [MASTROIANNI et al. 1996b].

#### 1.2.3.4 Pathogenese des BSND

In jüngster Zeit konnte ein weiteres Gen (*BSND*) entdeckt werden, welches maßgeblich an der Funktion der renalen Chloridkanäle ClC-Ka und b beteiligt und auf Chromosom 1p gelegen ist. Es kodiert für ein Protein, welches als Barttin bezeichnet wird und aus zwei Transmembrandomänen besteht. Intrazellulär finden sich ein 8 Aminosäuren langer N- und ein 266 Aminosäuren langer C-Terminus. Dieser C-Terminus formt dabei eine Interaktionsdomäne mit dem N-Terminus des ClC-Kb [WALDEGGER et al. 2002]. Die Interaktion von Barttin und ClC-Kb als Voraussetzung für eine intakte Kanalfunktion konnte dadurch unterstrichen werden, dass nach Injektion von RNA des ClC-Kb und RNA von Barttin in Oocyten erstmalig Elektrolytströme des Chloridkanals gemessen werden konnten. Die Expression von Barttin beschränkt sich nicht nur auf die Niere (dünner und dicker aufsteigender Teil der Henleschen Schleife), sondern es findet sich zusätzlich noch in verschiedenen Zellen des Innenohres im Bereich der Stria vascularis (entlang der Wandung des Endolymphschlauches) und an der Basis der Crista ampullaris [BIRKENHÄGER et al. 2001]. Eine Mutation im *BSND* führt zu einer Funktionseinschränkung bzw. einem Funktionsverlust des ClC-Ka und b in der Niere und dem Innenohr. Im Innenohr kommt es dabei zu einer Störung der für die Funktion notwendigen Elektrolytkonzentrationen der Endolymphe, woraus letztendlich der beschriebene Hörverlust resultiert. Noch nicht eindeutig geklärt ist die Frage, ob Barttin selbst auch eine eigene Kanal- oder Transporterfunktion besitzt oder ob es einen ausschließlich modulierenden Charakter für den ClC-Kb besitzt.

## 1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

### 1.3.1 Mutationsanalyse

Im Vordergrund dieser Arbeit steht die Mutationssuche und deren Analyse. Untersucht werden zwei Gene (ROMK und ClC-Kb), bei denen bereits Mutationen bei verschiedenen Formen des Bartter-Syndroms beschrieben wurden, deren endgültige Bedeutung aber noch nicht hinreichend geklärt ist. Bei der Auswahl der Patientenkohorte war maßgebend, dass die Patienten einen HPS- oder einen cBS-Phänotyp bzw. einen überschneidenden Phänotyp aufwiesen. Alle Patienten sind so lange sowohl im ROMK als auch im ClC-Kb-Gen untersucht worden, bis beide heterozygoten bzw. eine homozygote Mutation identifiziert worden ist.
Ziel dieser Mutationsanalyse ist es, die Bedeutung von ROMK und ClC-Kb in Bezug auf die Pathogenese zu unterstreichen und die Bedeutung verschiedener Mutationen zu klären bzw. zu diskutieren.

#### 1.3.1.1 Vorgehensweise

Zu Beginn wurde für die Mutationsanalyse ein Kollektiv aus 71 Patienten zusammengestellt. Aufgenommen wurden Patienten, die sich aufgrund des in Kapitel 7 beigefügten Fragebogens entsprechend ihrer klinischen Auffälligkeiten entweder dem HPS, dem cBS bzw. sich nicht eindeutig einer der beiden Gruppen zuordnen ließen, ein Gitelman-Syndrom allerdings unwahrscheinlich war.
Im Anschluss an die Zuordnung zu einer der Entitäten wurde für die molekulargenetische Untersuchung die DNA der Patienten extrahiert, um diese anschließend in den entsprechenden Genen auf Mutationen hin untersuchen zu können.
Zu Beginn der Mutationsanalyse wurden die Kandidatengene mittels PCR amplifiziert und im Folgenden einer Screening-Untersuchung mit Hilfe des Single-strand-conformation-polymorphism analysis (SSCP) unterzogen (siehe dazu auch Kapitel 2.6). Die hohe Sensitivität dieses Verfahrens ermöglicht die

**Abbildung 1.3** Schematische Darstellung der Vorgehensweise bei der Mutationsanalyse

Detektion von Mutationen in Form eines aberranten Bandenmusters. Aufgrund der geringen Spezifität lässt sich allerdings kaum eine Aussage zur Art der Mutation machen. Daher wurden alle im SSCP auffälligen Patientenproben im entsprechenden Gen einer DNA-Sequenzierung unterzogen, um die Mutation darzustellen und beschreiben zu können. Die einzelnen Verfahren sind in Kapitel 2 näher erläutert. Eine schematische Übersicht über die Vorgehensweise zeigt Abbildung 1.3.

#### 1.3.1.2 Das ROMK-Gen (*KCNJ1*)

Nachdem *KCNJ1* als Kandidatengen für das Auftreten des HPS entdeckt wurde, konnten in verschiedenen Arbeiten eine Reihe von Mutationen nachgewiesen werden [SIMON et al. 1996b] [ICSBS 1997]. Die weitere Aufklärung der Genstruktur und deren Klonierung zeigte, dass durch

alternatives Splicing fünf verschiedene Isoformen des ROMK (ROMK1-5) exprimiert werden [SHUCK et al. 1994]. Die einzelnen ROMK-Isoformen unterscheiden sich anhand ihrer 5`-Region. Beim ROMK1 kodieren die Exone 4 und 5, während die Isoformen ROMK2-5 aus den Exonen 1 und 5 zuzüglich einer variablen Kombination der Exone 2 und 3 bestehen. Daraus resultiert, dass die Transkription entweder am 5`-Ende des Exon 1 oder des Exon 3 initiiert. Eine schematische Übersicht gibt Abbildung 1.4.

Der ROMK1 besteht aus 389 Aminosäuren, die von den Exonen 4 und 5 kodiert werden. Die entsprechende Promotor-Region liegt im Falle des ROMK1 vor dem Exon 4, im Falle der Isoformen ROMK2-ROMK5 vor dem Exon 1.

Allen Isoformen des ROMK ist das Vorhandensein des Exon 5 gemeinsam. Es macht den weitaus größten Teil des Proteins aus und ist daher von

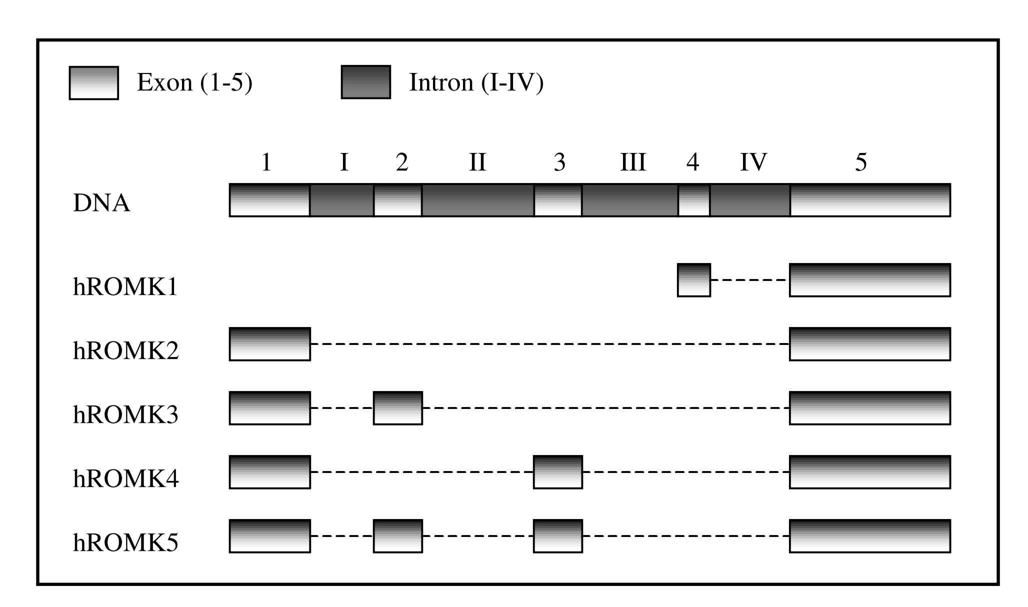



**Abbildung 1.4** Genomische Organisation der Isoformen 1-5 des *KCNJ1*

entscheidendem Interesse bei der Mutationssuche. Die große Zahl bislang veröffentlichter Mutationen und die Ergebnisse elektrophysiologischer Untersuchungen unterstreichen die Bedeutung dieses Exons für die Kanalfunktion. Dennoch werden auch die Exone 2 und 4 in die Mutationsanalyse mit einbezogen, da man inzwischen weiß, dass Mutationen in diesen Bereichen durch die Veränderung der Transskriptionselemente ebenfalls zum Auftreten des HPS führen. Zudem kodiert das Exon 4 für den N-Terminus von ROMK1.

1.3.1.3 Das ClC-Kb-Gen (*ClC-Kb*)

Bei dem basolateral gelegenen Chloridkanal ClC-Kb handelt es sich um ein 687 Aminosäuren langes Protein mit 19 Exonen. Eine schematische Darstellung zeigt Abbildung 1.5.
Neben dem ClC-Kb findet sich in der Niere der strukturell ähnliche Chloridkanal ClC-Ka. Beide Kanäle zeigen eine Sequenzhomologie auf Proteinebene von ca.

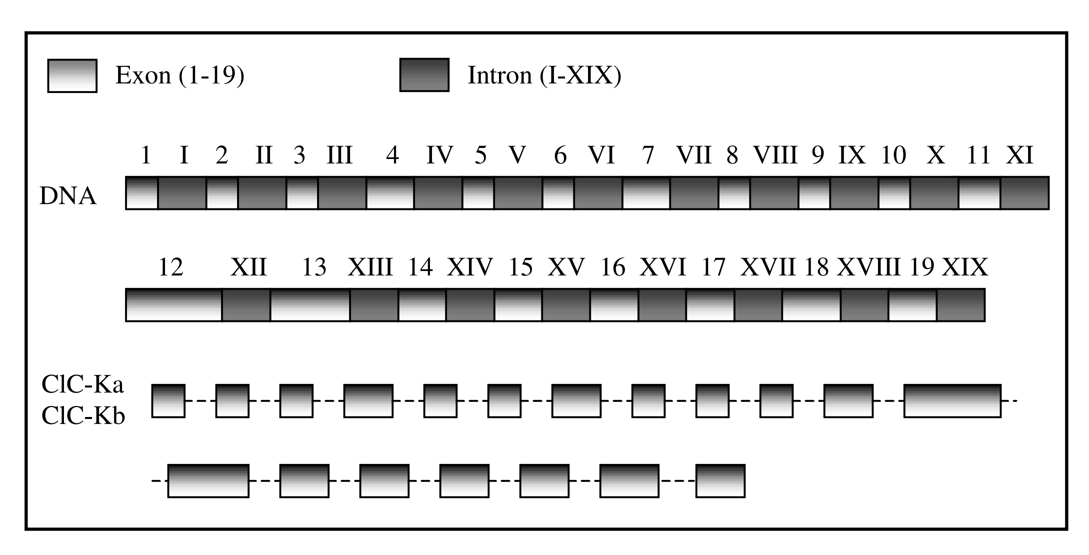



**Abbildung 1.5** Genomische Organisation des *ClC-Ka* und *ClC-Kb*

94%. Mutationen, die zum phänotypischen Bild einer der Varianten des Bartter-Syndroms führen, konnten bislang lediglich im ClC-Kb gefunden werden. Untersuchungen des ClC-Ka zeigen, dass dieser Kanal eine wichtige Rolle bei der Wasserrückresorption im dünnen aufsteigenden Teil der Henleschen Schleife zu haben scheint [MATSUMURA et al. 1999]. Mutationen im Bereich des ClC-Ka führten bei Mäusen zu dem Bild eines nephrogenen Diabetes insipidus. Die Plasmakonzentrationen von Natrium, Kalium, Chlorid und Bikarbonat sowie der pH-Wert waren nicht verändert. Diese Ergebnisse unterstreichen die Vermutung, dass der ClC-Ka nicht an der Pathogenese des Bartter-Syndroms beteiligt ist. Daher findet der ClC-Ka in dieser Arbeit keine weitere Beachtung.
Im Gegensatz zum oben dargestellten ROMK kodieren beim ClC-Ka und ClC-Kb alle Exone für das Protein.
Der Chloridkanal (ClC-Kb) spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der intrazellulären Chloridkonzentration in der Niere. Die genaue

Funktionsweise ist in Kapitel 4.2 dargestellt.
Jüngste Untersuchungen zeigen, dass ein zweites als Barttin bezeichnetes Protein für die Funktion dieses Chloridkanals von entscheidender Bedeutung ist. Es stellt für den ClC-Kb einen Aktivator dar, indem es zu einer Interaktion des C-Terminus von Barttin mit dem N-Terminus des Chloridkanals kommt [WALDEGGER et al. 2002]. Diese ist für die adäquate tubuläre Elektrolytresorption unentbehrlich.
Über die Auswirkungen von Mutationen auf die Kanalfunktion konnte vor Entdeckung von Barttin nur spekuliert werden, da alle Versuche einer Expression des Kanals an Oocyten erfolglos geblieben waren. Sowohl die alleinige Expression von ClC-Kb als auch von Barttin führten zu keinem positiven Ergebnis. Erst bei Koexpression von ClC-Kb und Barttin lassen sich durch elektrophysiologische Messungen Chloridströme nachweisen [ESTÉVEZ et al. 2001]. Da dies zum Zeitpunkt der Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit noch nicht möglich war, liegen bislang keine Ergebnisse elektrophysiologischer Untersuchungen von durch die Mutationen veränderten Kanäle vor, die im Folgenden dargestellt werden.

### 1.3.2 Zusammenfassende Fragestellung

- Lassen sich klare Zusammenhänge zwischen der Position der ROMK-Mutation und der Einschränkung der Kanalfunktion zeigen?
- Erlauben die vorliegenden klinischen Daten der Patienten mit HPS eine Korrelation mit der Art und Lokalisation der ROMK-Mutationen?
- Finden sich im ROMK auch außerhalb des Exon 5 Mutationen, die zum phänotypischen Bild des HPS führen?
- Kann durch Mutationsanalyse im Bereich des ClC-Kb die Rolle dieses Kanals für das klassischen Bartter-Syndrom gefestigt werden?
- Erlauben die vorliegenden klinischen Daten der Patienten mit cBS eine Korrelation mit der Art und Lokalisation der ClC-Kb-Mutationen?

# 2 Material und Methoden

## 2.1 Patienten

Die in dieser Arbeit untersuchten Patienten stammen aus dem Patientengut verschiedener europäischer Zentren, die sich mit der Molekulargenetik der hypokaliämischen Salzverlusttubulopathien beschäftigen, und das der Universitäts-Kinderklinik Marburg im Rahmen einer Zusammenarbeit zur Verfügung stand. Aufnahmekriterien für die Untersuchung waren die in Abschnitt 1.2.2 genannten klinischen Parameter, die als typisch oder hinweisend für die hereditären hypokaliämischen Salzverlusttubulopathien gelten. Ein standardisierter Fragebogen diente der weiteren Zuordnung und Phänotypisierung. Folgende Gesichtspunkte wurden dabei besonders berücksichtigt:

1. Vorgeschichte der Familie – ethnische Herkunft, Konsanguinität und betroffene Geschwister
2. Vorgeschichte des Patienten – Frühgeburtlichkeit, Polyhydramnion, perinatale Daten
3. Klinische Parameter – Nephrokalzinose
4. Laboruntersuchungen des Serums – Natrium, Kalium, Chlorid, Magnesium, Hydrogenkarbonat, Renin, Aldosteron
5. Laboruntersuchungen des Urins – Iso-/Hyposthenurie, Ausscheidung von Kalzium, Kalium, Natrium, Chlorid und $PGE_2$
6. Gegenwärtige Therapie – Elektrolytsubstitution, Behandlung mit Indometacin

In die Untersuchung einbezogen wurden überwiegend Patienten/Familien, deren Phänotyp eindeutig der antenatalen bzw. klassischen Form zuzuordnen war, bzw. Patienten, deren Zugehörigkeit zu einer der beiden Entitäten nicht sichergestellt werden konnte. Zusätzlich wurden noch einige Patienten untersucht, die die klinische Symptomatik eines Gitelman-Syndroms aufwiesen, bei denen die Mutationssuche im Bereich des NaCl-Kotransporters (*SLC12A3*)

aber erfolglos war. Eine Übersicht über die Patienten und deren Zuordnung gibt die Tabelle 2.1.

**Tabelle 2.1** Patientenübersicht

| | HPS | cBS | nicht zugeordnet | Insgesamt |
|---|---|---|---|---|
| Marburg | 26 | 16 | 10 | 52 |
| Paris | 6 | 5 | 5 | 16 |
| Freiburg | 1 | 1 | 0 | 2 |
| Nijmegen | 1 | 0 | 0 | 1 |
| gesamt | 34 | 22 | 15 | 71 |

Eine Gruppe von 50 gesunden Personen (entsprechend 100 Chromosomen) diente als Kontrollgruppe für die Mutationsanalyse und wurde zur Interpretation der im folgenden Text beschriebenen Mutationen herangezogen.

## 2.2 Allgemeine Materialien

### 2.2.1 Geräte und Hilfsmittel

Liste der allgemein verwendeten Geräte und Hilfsmittel, auf die im weiteren Text nicht mehr gesondert verwiesen wird:

- Milli-Q-Water-System (Fa. Millipore, Eschborn)
- Mikrowellenofen Modell R-7180 (Fa. Sharp, England)
- Vortex Laborrührer VF2 (Fa. Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen)
- Magnetrührer MR 3001 K (Fa. Heidolph, Kelheim)
- Überkopfdreher Modell REAX2 (Fa. Heidolph, Kelheim)
- Plattformschwenker Rocky® (Fa. Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau)
- Plattformschwenker (Eigenbau der Werkstatt der Universität Marburg)
- Analysenwaage Modell 510 (Fa. Kern, Albstadt)

- Feinwaage Modell R180D (Fa. Sartorius, Göttingen)
- Power Supply EPS 600 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- Power Supply EPS 3700 XL (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- Power Supply Consort E321
- Power Supply Consort E432
- UV-Flächenstrahler TFX (Fa. Vilber Lourmat, Marne/Frankreich)
- Photodokumentationssystem Bio-Print V.96 (Fa. Vilber Lourmat, Marne/Frankreich)
- Video Copy Processor P68E (Fa. Mitsubishi, Japan)
- Tischzentrifuge (Fa. Qualitron, Korea)
- Kühlzentrifuge Biofuge fresco (Fa. Heraeus, Osterode)
- Kühlzentrifuge Biofuge 13 (Fa. Heraeus, Osterode)
- Vakuumzentrifuge DNAplus (Fa. Heto, Allerød/Dänemark)
- Dampfsterilisator HAST 400L (Fa. Zirbus, Bad Grund)
- Pipetten und Spritzen (Fa. Eppendorf, Hamburg und Fa. Greiner, Nürtingen)
- Pipetten Pipetman (Fa. Gilson, Frankreich)
- Serologische Pipetten (Fa. Griener Labortechnik)
- Pasteurpipetten (Fa. Brand, Wertheim)
- Röhrchen und Tubus (Fa. Eppendorf, Hamburg und Fa. Greiner, Nürtingen)
- Spritzen (Fa. Becton Dickinson, Dublin/Irland)

### 2.2.2 Chemikalien und Reagenzien

Die aufgeführten Chemikalien entsprachen alle dem Reinheitsgrad p.A.

- Bromphenolblau Na-Salz Kat. Nr. A512.1 (Fa. Roth, Karlsruhe)
- DEPC Kat. Nr. D-5758 (Fa. Sigma, Dreisenhofen)
- Essigsäure 100% Kat. Nr. 1.00063 (Fa. Merck, Darmstadt)
- Ethidiumbromid Kat. Nr. 1.1615 (Fa. Merck, Darmstadt)
- Natriumhydroxid Kat. Nr. 0402 (Fa. Mallinckrodt Baker, Deventer/Holland)
- Tris Kat. Nr. 17-1321-01 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- Xylencyanol Kat. Nr. A513.1 (Fa. Roth, Karlsruhe)
- 100 Base-pair Ladder Kat. Nr. 27-4001-01 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- DEPC-$H_2O$
- 1 M Tris-HCl, pH 8,0
- 0,5 M EDTA, pH 8,0

- TE-Puffer, pH 8,0
- TAE-Puffer, pH 8,0
- TBE-Puffer
- Loading buffer

## 2.3 DNA-Gewinnung

### 2.3.1 Material

#### 2.3.1.1 Geräte

- Spektral-Photometer GeneQuant II Kat. Nr. 80-2105-98 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- Quarzglas-Küvette Kat. Nr. 105.202.008-QS (Fa. Hellma, Mühlheim)

#### 2.3.1.2 Chemikalien

- Nucleon® BACC2 Extraction Kit Kat. Nr. SL-8502 (Fa. Scotlab Bioscience, Coatbridge/Schottland) beinhaltet

| | |
|---|---|
| Lösung A: | 10 mM Tris-HCl |
| | 320 mM Sucrose |
| | 5 mM $MgCl_2$ |
| | 1% Triton X-100 |
| | pH 8,0 mit 40% NaOH, autoklaviert |
| Lösung B: | 400 mM Tris-HCl |
| | 60mM EDTA |
| | 150mM NaCl |
| | pH 8,0 mit 40% NaOH, autoklaviert |
| | 1% SDS |

5 M Natrium-Perchlorat
Nucleon® Resin Silica-Lösung

- Ethanol *absolut* Kat. Nr. 32205 (Fa. Riedel-de Haën, Seelze)
- Chloroform Kat. Nr. 1.02445 (Fa. Merck, Darmstadt)

### 2.3.2 DNA-Isolierung aus Vollblut

Für die DNA-Isolierung werden 5-10 ml EDTA-Blut benötigt. Um eine vorzeitige Zellschädigung zu vermeiden, sollte das Blut entweder innerhalb kurzer Zeit verarbeitet oder bei –80°C tiefgefroren werden. Nach der Überführung des Blutes in ein 50 ml Röhrchen wird es mit 4 Volumenanteilen der Lösung A versetzt, 4 Minuten im Überkopfdreher geschüttelt und anschließend weitere 4 Minuten bei 1300g und 4°C zentrifugiert. Daraufhin wird der Überstand vorsichtig dekantiert und das Pellet in 2 ml Lösung resuspendiert. Man überführt die Zellsuspension in ein 5-ml-Röhrchen und versetzt diese zur Entproteinierung mit 500 µl Natrium-Perchlorat. Das Gemisch wird einige Male vorsichtig geschüttelt.

Zu Beginn der folgenden DNA-Extraktion werden der Suspension 2 ml Chloroform zugefügt und das Ganze wiederum einige Minuten behutsam geschüttelt. Nach Zugabe von 300 µl Nucleon® Resin Silica-Lösung wird für mindestens 3 Minuten bei 1300g und 4°C zentrifugiert, anschließend der Überstand in ein neues 50-ml-Röhrchen überführt und das Proteinpellet verworfen. Zum Überstand wird gekühltes Ethanol *absolut* im Verhältnis 1:2 gegeben und das Röhrchen vorsichtig geschüttelt. Es kommt zur Präzipitation der DNA, sichtbar als feines Netzwerk. Die ausgefallene DNA wird mit einer Pasteurpipette isoliert, mindestens zweimal mit gekühltem 70% Ethanol gewaschen und in einem offenen 1,5-ml-Eppendorfröhrchen bei Raumtemperatur über Nacht und anschließend in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die getrocknete DNA wird je nach Menge mit 100 - 500 µl TE-Puffer resuspensiert und bei -20°C aufbewahrt.

Die Bestimmung der Konzentration der DNA wird nach vollständiger Resuspension mit Hilfe eines Spektralphotometers bei 260 nm durchgeführt, da die heterozyklischen, stickstoffhaltigen Basen bei dieser Wellenlänge ihr Absorptionsmaximum haben. Hierbei entspricht die Extinktion [E] von 1,0 bzw. 1 OD (optische Dichte Einheit) einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Zur Untersuchung der Probe auf mögliche Verunreinigungen mit Proteinen, deren Absorptionsmaximum bei 280 nm liegt, wird zusätzlich die Extinktion bei dieser Wellenlänge bestimmt. Der Quotient E $^{260}/_{280}$ gibt die Reinheit der Probe an und sollte bei einer sauberen DNA-

Präparation zwischen 1,7 und 2,0 liegen. Um Meßungenauigkeiten auszugleichen, sollten drei unabhängige Messungen durchgeführt und daraus der Mittelwert bestimmt werden. Zur Einstellung der Stammlösung wird die Probe mit DEPC-$H_2O$ bis auf eine Konzentration von 10 ng/µl verdünnt.

## 2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

### 2.4.1 Beschreibung

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein Verfahren, das der selektiven Vermehrung (Amplifikation) von DNA-Abschnitten dient und bei deren DNA-Synthesen durch die Verwendung von DNA-Polymerasen, die dem Verfahren seinen Namen geben, auf den Gebrauch von lebenden Zellen und Bakterien verzichtet werden kann. Das Prinzip beruht auf der enzymatischen Vermehrung eines vorliegenden DNA-Abschnittes, der millionenfach angereichert wird, um so in genügender Menge für Untersuchungen, wie z.B. den Nachweis von Mutationen, zur Verfügung zu stehen [WHITE et al. 1989].
Zur Initiierung der DNA-Synthese werden Oligonukleotid-Primer verwendet, die im Verlauf der zyklischen Reaktion immer wieder außerhalb des zu replizierenden Abschnittes binden müssen. Der Einsatz der PCR setzt daher die Kenntnis der Nukleotid-Sequenzen beidseits des zu untersuchenden DNA-Abschnitts voraus. Um den gewünschte DNA-Abschnitt spezifisch zu gewinnen, benutzt man flankierende Oligonukleotid-Primer, die gegenläufig an den komplementären Strängen binden. Die eigentliche Reaktion besteht aus sich wiederholenden Zyklen der Denaturierung, der Hybridisierung der Primer und schließlich der Elongation, d.h. der DNA-Synthese.
Aufgrund der hohen Temperaturen insbesondere während der Denaturierung und der DNA-Synthese mussten in der Anfangszeit nach Etablierung der Methode dem Reaktionsansatz nach jedem Amplifikationsschritt neue Enzymproben hinzugegeben werden [MULLIS u. FALOONA 1987]. Heute benutzt man thermostabile Polymerasen, die eine Aufeinanderfolge vieler Reaktionsschritte zulassen und das Verfahren maßgeblich erleichtern und vor

Kontamination schützen. Die Enzyme werden aus in heißen Quellen lebenden Bakterien gewonnen. Wichtigster Vertreter dieser Emzymklasse ist die aus dem thermophilen Bakterium Thermus aquaticus stammende Taq-Polymerase.

### 2.4.2 Material

#### 2.4.2.1 Geräte

- GeneAmp® PCR System 2400 (Fa. Perkin Elmer, Ueberlingen)
- GeneAmp® PCR System 9600 (Fa. Perkin Elmer, Ueberlingen)
- MikroAmp™ Reaction Tubes Kat. Nr. N801-0540 (Fa. Perkin Elmer, Ueberlingen)
- MikroAmp™ Base Kat. Nr. N801-5531 (Fa. Perkin Elmer, Ueberlingen)
- MikroAmp™ Tray/Retainer Assembly Kat. Nr. N801-5530 (Fa. Perkin Elmer, Ueberlingen)

#### 2.4.2.2 Chemikalien

- *Taq* DNA Polymerase Kat. Nr. D1806 (Fa. Sigma, Taufkirchen)
- 10x Reaction Buffer Kat. Nr. P2192 (Fa. Sigma, Taufkirchen) (100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 0,01% Gelatine)
- Polymerization Mix Kat. Nr. 27-2094-01 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden) (20mM dNTP)
- Oligonukleotid-Primer (Fa. Life Technologies, Eggstein)
- DEPC-$H_2O$

### 2.4.3 Durchführung

Die für die PCR benötigten synthetischen Primer wurden im Vorfeld der Arbeit erworben. Die Sequenz kann entweder aus Publikationen entnommen oder mit Hilfe von DNA-Sequenzen selbst entwickelt werden (Sequenzen siehe Tabelle 3.1 und 3.4). Der Forward-Primer besteht aus einer antegraden DNA-Sequenz des Forward-Stranges im 5`-Bereich des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes,

der Reverse-Primer aus einer DNA-Basensequenz des Reverse-Stranges im 3`-Bereich. Zu Beginn wird ein Reaktionsgemisch angesetzt, welches aus dem Forward- und dem Reverse-Primer, Reaktionspuffer, Dinukleosidtriphosphaten, und Taq-Polymerase besteht. Eine definierte Menge dieses Reaktionsgemisches (15µl) wird auf jeweils 5 µl der zu untersuchenden DNA gegeben.
In einem Gesamtvolumen von 20 µl befinden sich:

| | |
|---|---|
| 5,0 µl | DNA |
| 9,8 µl | DEPC-Wasser |
| 1,0 µl | Forward-Primer |
| 1,0 µl | Reverse-Primer |
| 1,0 µl | dNTP |
| 2,0 µl | Puffer |
| 0,2 µl | Taq-Polymerase |

Zu Beginn der Reaktion wird die DNA initial für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und dabei in ihre Einzelstränge aufgespalten. In der sich anschließenden Zyklusphase kommt es mit jedem durchlaufenen Zyklus zu einer Verdopplung der DNA-Menge. Der Zyklus selbst besteht aus drei aufeinander abgestimmten Teilreaktionen, für die jeweils unterschiedliche Temperaturen erforderlich sind. Zu Beginn eines jeden Zyklus wird für 45 Sekunden bei 94°C denaturiert. Für den nächsten Schritt des so genannten Annealing (Hybridisierung der Primer oder Anheftung) wird bis auf eine für den Primer spezifische Temperatur, die vorher experimentell ermittelt werden muss und meistens zwischen 50°C und 65°C liegt, abgekühlt. Diese Temperatur wird für weitere 30 Sekunden gehalten und anschließend für den Schritt der Elongation (DNA-Synthese) für 45 Sekunden auf 72°C angehoben. Während dieser Zeit heftet die Taq-Polymerase Nukleotide an die 3`-OH-Primer-Enden und es werden somit zwei komplementäre Stränge synthetisiert. Diese Zyklen werden 30 mal wiederholt. Die PCR endet mit einem Kettenverlängerungsschritt von 5 Minuten bei 72°C. Die PCR-Produkte werden vom Gerät auf 4°C heruntergekühlt und im Folgenden bis zum weiteren Gebrauch bei 4°C bis –20°C gelagert. Abweichungen vom oben genannten Schema werden an entsprechender Stelle

kenntlich gemacht. Eine schematische Darstellung zum Funktionsprinzip zeigt Abbildung 2.1.

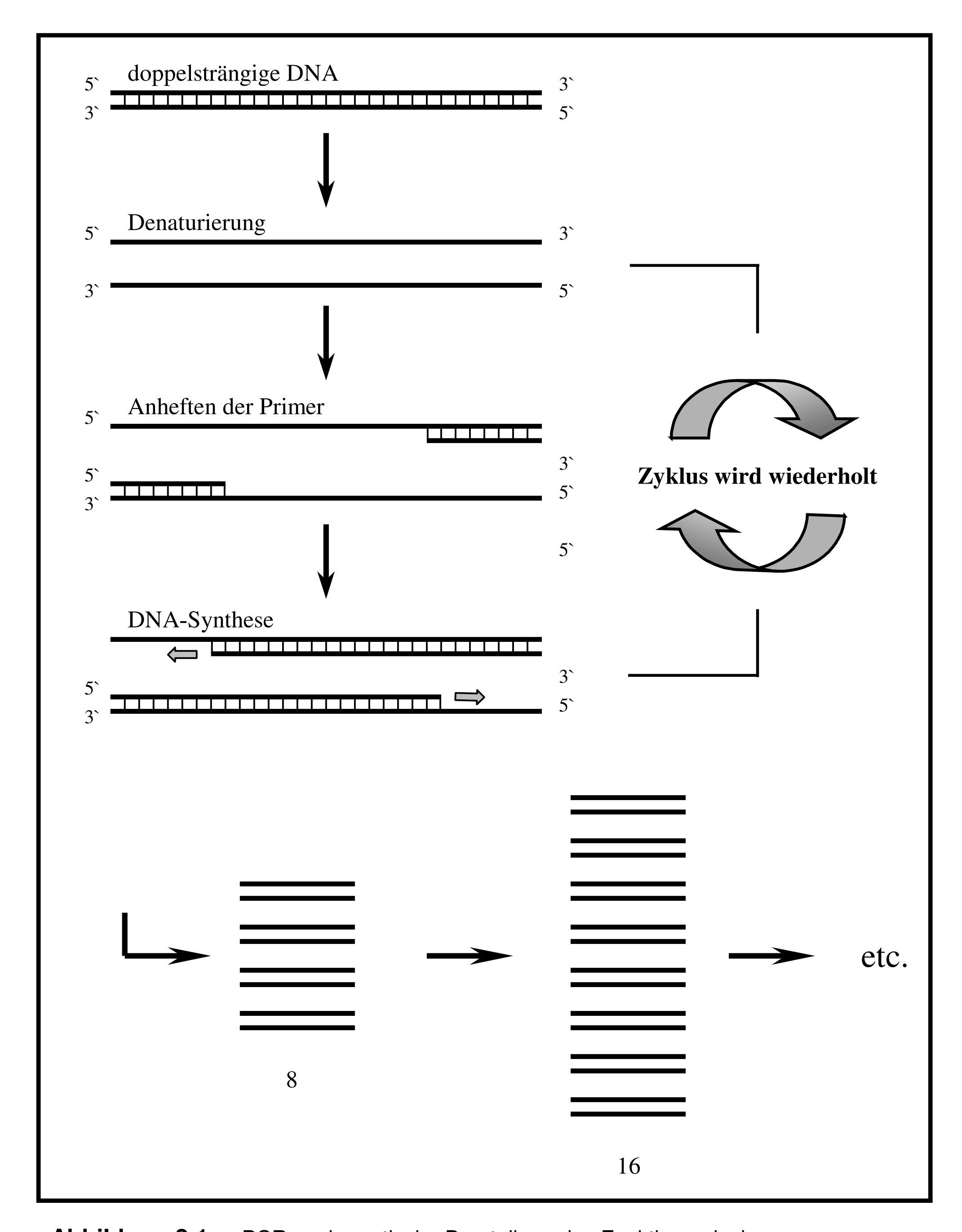



**Abbildung 2.1** PCR - schematische Darstellung des Funktionsprinzips

Die Auswertung der PCR erfolgt meist rein qualitativ, gelegentlich auch semiquantitativ mittels Agarose-Gelelektrophorese. Hierbei wird festgestellt, ob genügend DNA für weitergehende Untersuchungen angereichert wurde. Genaue Informationen zu diesem Verfahren sind im Kapitel 2.5 beschrieben.

## 2.5 Gelelektrophorese

### 2.5.1 Beschreibung

Um Nukleinsäure-Moleküle zu trennen, sind die Gelelektrophoresen in Agarose und Polyacrylamid am geeignetsten. Der Vorteil dieser beiden Verfahren liegt in ihrem „Molekularsieb-Effekt“, bei dem die Moleküle in Abhängigkeit von ihrer Größe wandern, wobei sich kleine Moleküle im Gel schnell und große eher langsam bewegen. Da die Hauptladungsträger der Nukleinsäuren die Phosphatgruppen sind und diese für jeden Nukleotidbaustein den gleichen pk-Wert haben, hängt die Auftrennung zum einen nicht von Ladungsunterschieden ab, zum anderen ist eine Trennung im Rahmen von pH-Wert-Unterschieden wenig effizient.

Bei der Trennung von linearer, doppelsträngiger DNA erfolgt diese proportional zum Molekulargewicht, da hier ein konstanter Ladungs-/Massen-Quotient vorliegt. Anders ist dies bei relaxierter bzw. anders konformierter DNA, die deutliche Unterschiede im Laufverhalten zeigt. Diese Tatsache macht sich die SSCP-Analyse zunutze (siehe Kapitel 2.6).

Die Konzentration des Agarose-Gels wird durch die Länge des zu erwartenden DNA-Fragmentes festgelegt. Ein DNA-Fragment mit einer Länge von 1000 bp-15000 bp lässt sich am besten bei einer Agarose-Konzentration von 0,6% (w/v) auftrennen. Gele mit höheren Konzentrationen eignen sich eher für den Bereich von 100-2000 bp. Zur Darstellung einzelner Nukleotide sind hochkonzentrierte Polyacrylamid-Gele erforderlich, die im Rahmen der molekulargenetischen Arbeit bei Sequenzierungen zum Einsatz kommen.

Zur Elektrophorese gehören in der Grundform eine Elektrophoreseeinheit und eine Spannungsversorgung (Gleichstrom). Die Elektrophoreseeinheit besteht aus dem mit Puffer gefüllten Puffertank, in den das Gel vollständig eingetaucht wird. Bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird das Gel zwischen zwei Platten gegossen, sodass nur noch die freien Enden in die Pufferlösung eintauchen. Die zwischen der Start- und Stopseite mittels Elektroden angelegte Gleichspannung bewirkt eine Wanderung der negativ geladenen DNA-Moleküle in Richtung der Anode. Die gewählten Laufbedingungen wie Stromstärke, Pufferbedingungen und besonders die Konzentration des Trägermediums

beeinflussen die Laufgeschwindigkeit maßgeblich.

### 2.5.2 Material

#### 2.5.2.1 Geräte

- Elektrophoresekammer (Fa. MWG-Biotech)

#### 2.5.2.2 Materialien

- Qualex-Gold-Agarose (Fa. AGS GmbH, Heidelberg)
- TAE-Puffer 1x
- DEPC-$H_2O$
- Loading buffer 6x (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- 100 Base-pair Ladder-Lösung (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- Ethidiumbromid

### 2.5.3 Durchführung

Zur Auswertung des PCR-Produktes wird zunächst ein Agarose-Gel mit einer Konzentration von 1,2% in TAE-Puffer 1x gegossen und zum Aushärten beiseite gestellt. Die Elektrophoresekammer wird ebenfalls mit TAE-Puffer 1x so weit gefüllt, dass das Gel vollständig von Puffer bedeckt wird. Nun pipettiert man 8 µl des PCR-Produktes, 3 µl Loading buffer 6x und 4 µl DEPC-$H_2O$ zusammen und beschickt damit die Taschen des mittlerweile ausgehärteten und in Puffer eingetauchten Agarose-Gels. Der mitgeführte Standard (100 Base-pair Ladder-Lösung) dient später der Ermittlung der Fragmentlängen, die ebenfalls mitgeführte Negativ-Kontrolle dem Ausschluss einer Kontamination. Der hinzugefügte Farbstoffpuffer gibt eine grobe Orientierung über die zurückgelegte Laufstrecke. Das Gel wird an die Spannungsquelle angeschlossen und man lässt die DNA für ca. 1 Stunde bei 100V und 100mA wandern.

Nach Beendigung des Laufes wird das Gel für ca. 15 Minuten in Ethidiumbromid (10 µl Ethidiumbromid auf 100 ml Milli-Q- $H_2O$) gebadet und anschließend für weitere 15 Minuten unter fließendem Wasser gespült. Die vom Ethidiumbromid angefärbten DNA-Banden fluoreszieren intensiv orange, da sich Ethidiumbromid zwischen den Basenpaaren einlagert (interkaliert). Daher ist es wichtig, die basengepaarten Bereiche während der Elektrophorese zu erhalten (native Elektrophorese). Die DNA-Banden werden nun mit Hilfe eines Flächenstrahlers sichtbar gemacht und dokumentiert (Abbildung 2.2). Sollte sich auch im Bereich des mitgeführten Leerwertes eine Bande zeigen, ist die richtige Beurteilung der PCR wegen einer Kontamination nicht mehr möglich und das Produkt zu verwerfen.

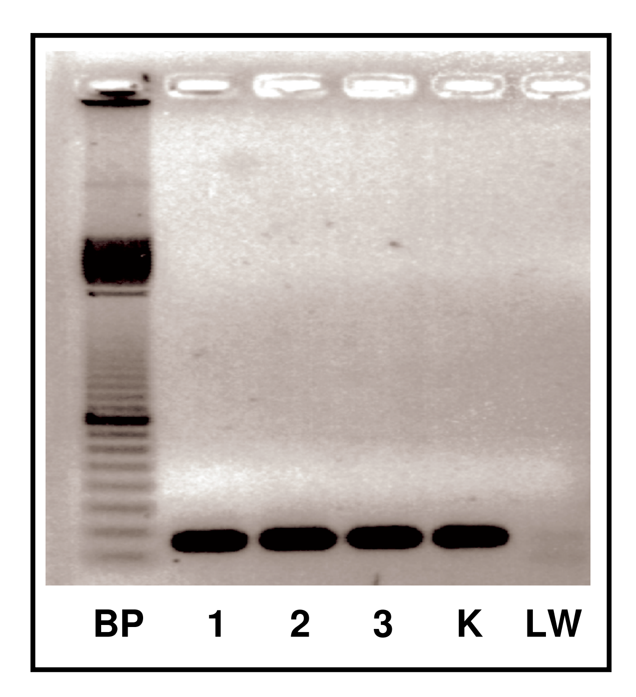



**Abbildung 2.2** Agarose-Gel mit aufgetragenen PCR-Produkten nach Ethidiumbromidfärbung. Laufspur 1-3 Pat.-DNA, K: Wildtyp-Kontrolle, LW: Leerwert (Negativkontrolle), BP: mit-geführter Standard (100 Base-pair ladder)

## 2.6 SSCP-Analyse

### 2.6.1 Beschreibung

Die SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) –Analyse ist ein Verfahren zum Aufspüren von Mutationen bzw. Polymorphismen in einem zu untersuchenden DNA-Abschnitt. Als ausreichend sensitive Screening-Methode

lässt die Auswertung des SSCP lediglich die Aussage über das Vorhandensein einer strukturellen Veränderung der untersuchten DNA zu. Ob es sich dabei um den Austausch eines einzelnen Nukleotids (Punktmutation), den Verlust

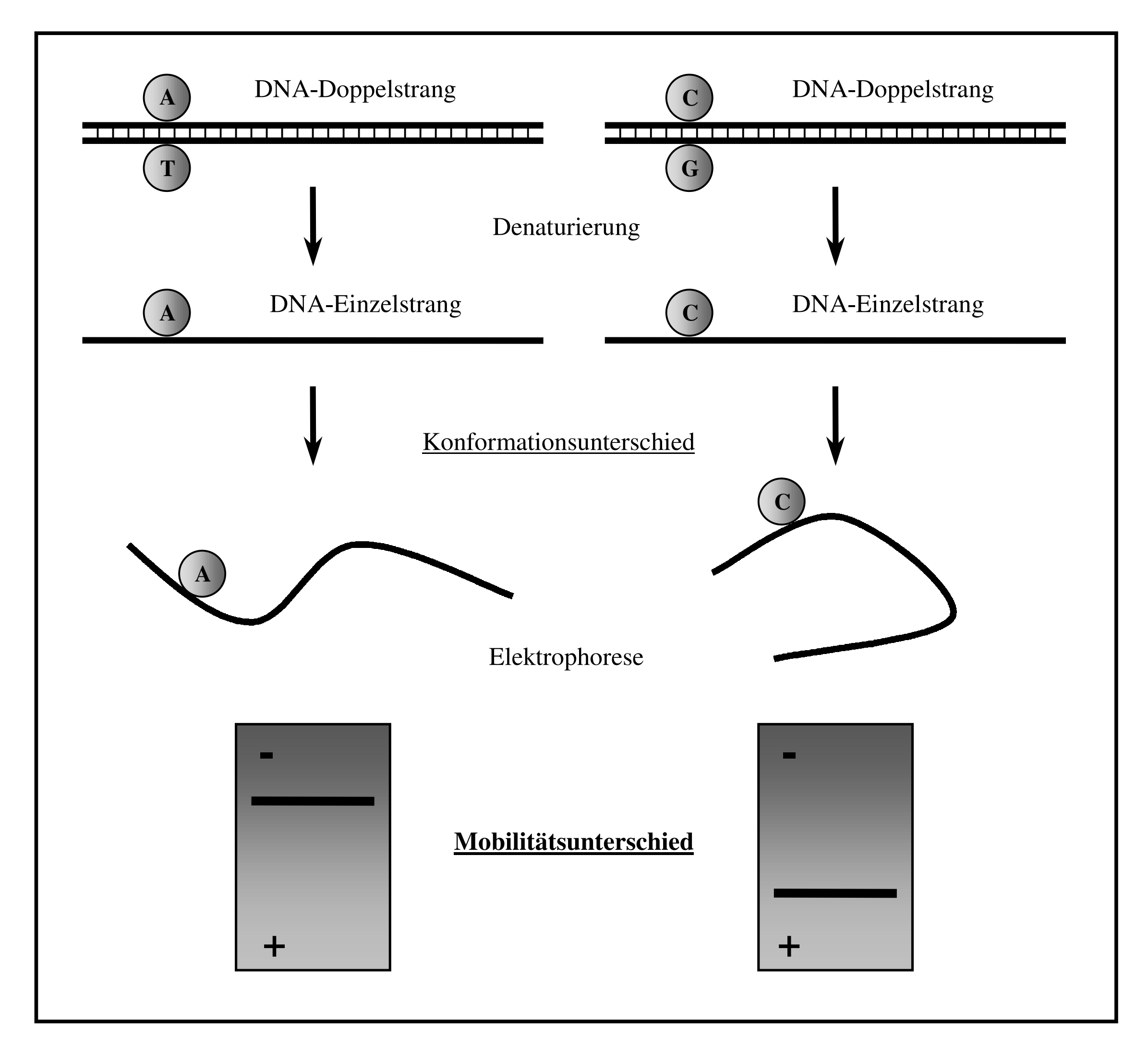



**Abbildung 2.3** SSCP – schematische Darstellung des Funktionsprinzips

(Deletion) bzw. das Einfügen einer Base (Insertion) oder gar den Verlust mehrerer Basen handelt, kann erst nach der sich anschließenden Sequenzierung der auffälligen DNA-Proben (siehe Kapitel 2.7) mit Sicherheit gesagt werden.

Bei der SSCP-Analyse handelt es sich um eine nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese, bei der das Laufverhalten und die Laufgeschwindigkeit gleicher denaturierter DNA-Abschnitte in Abhängigkeit von der Temperatur, dem pH-Wert etc. beurteilt werden. Eine Veränderung der Nukleotidsequenz führt häufig zu einer Komformationsänderung, die einen Mobilitätsunterschied (siehe Abbildung 2.3) bewirkt und somit das Laufverhalten

verändert.
Die Kenntnis der Nukleotidsequenz und die Vervielfältigung des zu untersuchenden DNA-Abschnittes mittels PCR, wobei die Fragmentlänge 300 bp nicht überschritten werden sollte, sind Voraussetzungen für dieses Verfahren. Die entsprechenden Primer binden im Intronbereich und schließen somit die gesamte kodierende Sequenz inklusive der dazugehörigen Splice-Sites ein. Handelt es sich bei den zu untersuchenden Exonbereichen um Fragmente mit einer Länge über 300 bp, müssen mehrere Fragmente mit überlappenden Sequenzen ausgesucht werden.
Die PCR-Produkte werden vor der eigentlichen Elektrophorese erhitzt und somit in Einzelstränge aufgespalten. Nach Beendigung des Laufes erfolgt eine Anfärbung des Gels mit Silbernitrat.

### 2.6.2 Material

#### 2.6.2.1 Geräte

- Thermomixer Modell 5436 (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- Kühlgenerator Multi Temp® III Kat. Nr. 18-1102-78 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- ElektrophoresisUnit Multiphor® II Kat. Nr. 18-1018-06 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- GelPool Kat. Nr. 18-1031-58 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- PaperPool Kat. Nr. 18-1031-59 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)

#### 2.6.2.2 Chemikalien

- CleanGel DNA Analysis Kit Kat. Nr. 17-1198-06 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden) beinhaltet

| | |
|---|---|
| CleanGel 48S | Sammelgel (5%) |
| | Trenngel (10%) |
| Gelpuffer | Puffer pH 8,45 |
| | 0,001% Bromphenolblau |
| | 0,001% Orange G |

| | |
|---|---|
| Elektrodenpuffer | Puffer pH 7,9 |
| Papierelektroden | |

- Formamid Kat. Nr. 1.09684 (Fa. Merck, Darmstadt)
- PlusOne™ DNA Silver Staining Kit Kat. Nr. 17-6000-30 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden) beinhaltet

| | | |
|---|---|---|
| Fixierlösung 5x | Benzschwefelsäure | 3,0% w/v in 24% Ethanol |
| Silbernitratlösung 5x | Sibernitrat | 1,0% w/v |
| | Benzschwefelsäure | 0,35% w/v in $H_2O$ |
| Entwicklerlösung 5x | Natriumkarbonat | 12,5% w/v in $H_2O$ |
| Stop-Lösung 5x | Essigsäure | 5,0% v/v |
| | Natriumazetat | 25,0% v/v |
| | Glycerol | 50,0% in $H_2O$ |

Formaldehyd 37% w/v in $H_2O$
Natriumthiosulfat 2% w/v in $H_2O$

### 2.6.3 Durchführung

Am Anfang der SSCP-Analyse steht die Amplifizierung der DNA mittels PCR (siehe Kapitel 2.4) und deren Kontrolle mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.5).

Das trockene Polyacrylamidgel wird im GelPool mit 25 ml Gelpuffer für mindestens eine Stunde rehydriert. Um eine optimale Verteilung des Puffers zu erreichen, wird das Gel während dieser Zeit vorsichtig geschüttelt, wobei die Bildung von Luftblasen unter dem Gel zu vermeiden ist, da es an diesen Stellen nicht rehydriert und der spätere Lauf deutlich behindert wird. In der Zwischenzeit werden in je einem Eppendorf-Röhrchen die PCR-Produkte (4 µl) mit Formamid im Verhältnis 1:1 zusammenpipettiert. Nach kurzem Schütteln und Abzentrifugieren wird die DNA bei 95°C 5 Minuten lang denaturiert und anschließend bis zur Weiterverwendung (mindestens 5 Minuten) auf 4°C heruntergekühlt.

Das rehydrierte Gel wird mit Filterstreifen getrocknet, wobei darauf zu achten ist, dass die Matrix dabei nicht beschädigt wird. Die auf die gewünschte Temperatur gebrachte Kühlplatte der Elektrophoreseeinheit wird mit 70% Ethanol benetzt und das Gel aufgebracht. Auch hier ist die Bildung von

Luftblasen unter dem Gel zu vermeiden.
Nach dem Pipettieren der DNA-Proben in die vorgesehenen Geltaschen werden in Puffer getränkte Papierstreifenelektroden auf beiden Seiten des Gels aufgebracht. Dabei ist zu beachten, dass diese nicht mehr als 5 mm weit auf dem Gel liegen. Die Elektroden werden an eine Spannungsquelle angeschlossen, wobei die Spannung in Abhängigkeit von der gewünschten Lauftemperatur zu wählen ist. Bei einer Temperatur von 15°C lässt man die Proben anfänglich für 10 Minuten bei 200 V, 23 mA und 5 W und anschließend für weitere 60 Minuten bei 600 V, 30 mA und 18 W laufen. Bei einer Lauftemperatur von 4°C lässt man das Gel für 4 Stunden bei 200 V, 23 mA und 5 W laufen, da eine höhere Spannung aufgrund der damit verbundenen höheren Temperaturentwicklung zur Kondenswasserbildung führt und die Qualität des Laufes beeinträchtigt.
Neben den zu untersuchenden Proben sollten immer zwei Kontrollproben mitlaufen, von denen eine denaturiert und die andere nativ ist. Dies dient bei der Auswertung der besseren Unterscheidung vom Wildtyp.

### 2.6.4 Auswertung

Das Gel wird nach Beendigung der Elektrophorese einer Silbernitratfärbung unterzogen, die sich durch hohe Sensitivität der Darstellung und gute Reproduzierbarkeit auszeichnet [HEUKESHOVEN u. DERNICK 1985].
Das Gel wird in einem Metallbecken für 30 Minuten mit 250 ml Fixierlösung 1x versetzt. Um eine gleichmäßige Färbung zu erreichen, wird das Becken auf einen Plattformschwenker gestellt. Der Fixierung schließt sich die Silberimprägnierung an. Dazu wird die Fixierlösung verworfen und das Gel für weitere 30 Minuten in 250 ml Silbernitratlösung 1x gebadet. Anschließend verwirft man auch diese Lösung und schwenkt das Gel für einige Minuten in deionisiertem Wasser. In dieser Zeit wird die Fixierlösung angesetzt. Da diese sehr instabil ist, sollte sie erst unmittelbar vor Gebrauch hergestellt werden. Zu 50 ml Entwicklerlösung werden 250 µl Natriumthiosulfat und 250 µl Formaldehyd pipettiert und das Ganze mit deionisiertem Wasser auf 250 ml

aufgefüllt. Die Lösung wird gut durchgeschüttelt und auf das Gel gegeben. Während der folgenden Entwicklung werden die Banden sichtbar. Die Reaktion sollte abgebrochen werden, sobald die Banden die höchste Schärfe erreicht haben. Dazu wird die Entwicklerlösung verworfen und 250 ml Stop-Lösung 1x hinzugefügt, in der das Gel mindestens 30 Minuten geschwenkt werden sollte. Wird die Entwicklungsreaktion zu spät abgestoppt, kommt es zur Dunkelfärbung des Gels, die mit einem bisweilen deutlichen Qualitätsverlust einhergeht. Zum Schluss wird das Gel kurz mit deionisiertem Wasser gespült und an der Luft getrocknet.




**Abbildung 2.4** SSCP-Auswertung; K: Kontrolle (Wildtyp), P: Patientenprobe mit Band-Shift

Zur Auswertung der Banden vergleicht man die Bandenmuster der Patienten mit denen der Kontrollen. Gesucht wird nach Abweichungen, so genannten Band-Shifts (siehe Abbildung 2.4). Findet sich ein abberantes Bandenmuster, muss zunächst untersucht werden, ob es sich nicht um einen Polymorphismus, d.h. um eine Veränderung des vorliegenden DNA-Abschnittes ohne Krankheitswert, handelt. Dies lässt sich meist durch den Vergleich von 25 Wildtyp-Kontrollen (entsprechend 50 Allelen) mit dem fraglichen Bandenmuster feststellen, wobei keine der Wildtyp-Banden diese Auffälligkeit zeigen darf. Handelt es sich um ein nicht im Wildtyp-Kollektiv vorkommendes Bandenmuster oder um eines, bei dem ein Polymorphismus nicht sicher ausgeschlossen werden kann, bringt allein die in Kapitel 2.7 beschriebene Sequenzierung des DNA-Abschnittes letztendliche Klarheit.

## 2.7 DNA-Sequenzierung

### 2.7.1 Beschreibung

Ziel der DNA-Sequenzierung ist die Bestimmung der Basenfolge auf Molekülebene. Hierzu stehen grundsätzlich zwei Methoden zur Verfügung: Maxam und Gilbert entwickelten die chemische Sequenzierung, bei der die DNA mit Chemikalien an bestimmten Stellen gespalten und so eine Reihe von Fragmenten erzeugt wird [MAXAM U: GILBERT 1977]. Die enzymatische Kettenabbruchmethode nach Sanger und Coulson beruht auf der Synthese von DNA-Strängen, die an einem modifizierten Nukleotid abbricht [SANGER et al. 1977]. Diese ist in Abbildung 2.5 schematisch dargestellt.
Aufgrund ihrer hohen Genauigkeit und Verlässlichkeit ist die enzymatische Kettenabbruchmethode heute das Verfahren der Wahl und findet auch in der vorliegenden Arbeit Anwendung.
Am Anfang der Sequenzierung steht die Amplifikation des zu untersuchenden DNA-Abschnittes mittels PCR. Hierbei unterscheiden sich die verwendeten Primer (Forward- und Reverse-Primer) von denen der herkömmlichen PCR durch das zusätzliche Vorhandensein einer spezifischen 5`-Sequenz von 20 Basenpaaren, an die bei der weiteren Sequenzreaktion ein fluoreszenz-markierter Universal-Primer, der komplementär zu dieser Sequenz ist, bindet. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass für die zweite Sequenzreaktion unabhängig von dem zu untersuchenden DNA-Abschnitt mit dazugehörigem Primer der gleiche Sequenz-Primer benutzt werden kann.
Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl der Vorwärts- als auch der Rückwärts-Strang sequenziert, welches die Modifikation beider PCR-Primer erfordert. So erhält der Forward-PCR-Primer zur Sequenzierung des kodierenden Stranges einen entsprechenden Abschnitt am 5`-Ende, an den der Forward-Primer der Sequenz-Reaktion (P 172) binden kann. Analog trägt der Reverse-PCR-Primer zur Sequenzierung des nicht-kodierenden Stranges ein 5`-Ende, die spezifisch für den Reverse-Primer der Sequenz-Reaktion (M 13) ist.
Die in Tabelle 2.2 gezeigten Sequenzen der Sequenz-Primer sind so gewählt,

dass sie mit der PCR-Reaktion selbst nicht interferieren.
In der zweiten so genannten Cycle-Reaktion entstehen durch sich wiederholende Denaturierungs- und Elongationsschritte DNA-Fragmente, deren Länge durch den Einbau eines modifizierten Nukleosidtriphosphats determiniert sind. Diese Nukleosidtriphosphate tragen an ihrer 3`-Position anstelle der üblichen OH-Gruppe (so genannte *D*i*d*esoxy*n*ukleosid*t*ri*p*hosphate, ddNTP) lediglich ein H-Atom. Dieses macht eine Kettenverlängerung unmöglich, da die Bildung der notwendigen Phosphorsäureester von dem Vorhandensein einer 3`-OH-Gruppe abhängt.

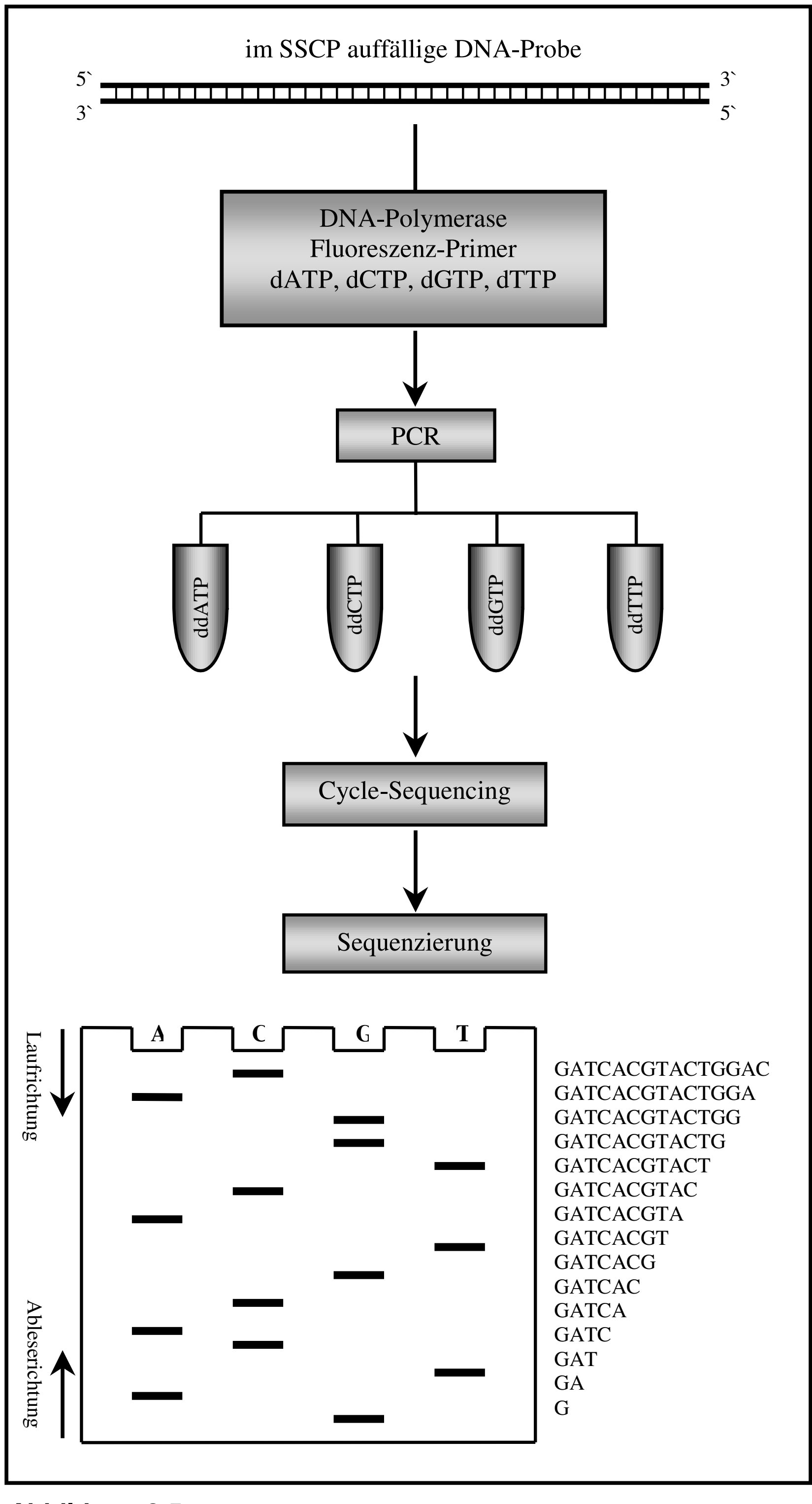



**Abbildung 2.5** Sequenzierung - schematische Darstellung des Funktionsprinzips

**Tabelle 2.2** Oligonukleotid-Sequenz zur Primermodifikation

| *Name* | *5`-3`-Sequenz* |
|---|---|
| P 172 (Forward) | TAT TAT AGG GCG AAT TGG GT |
| M 13 (Reverse) | TAT GTA AAA CGA CGG CCA GT |

Für die Sequenzierung existieren vier Reaktionsgemische, von denen jedes Desoxynucleotide (dNTP) und ein spezifisches Didesoxynucleotid (ddNTP) enthält. Das Verhältnis der normalen dNTP zum ddNTP wird so gewählt, dass im statistischen Mittel in jedem Reaktionsgemisch die Nukleotid-Kette überall dort abgebrochen wird, wo sich im Normalfall ein Nukleotid, das dem gewählten ddNTP entspricht, befände [HENSEN 1999]. Am Ende der Cycle-Reaktion beinhaltet jeder Ansatz eine Anzahl an DNA-Fragmenten, an deren Ende sich

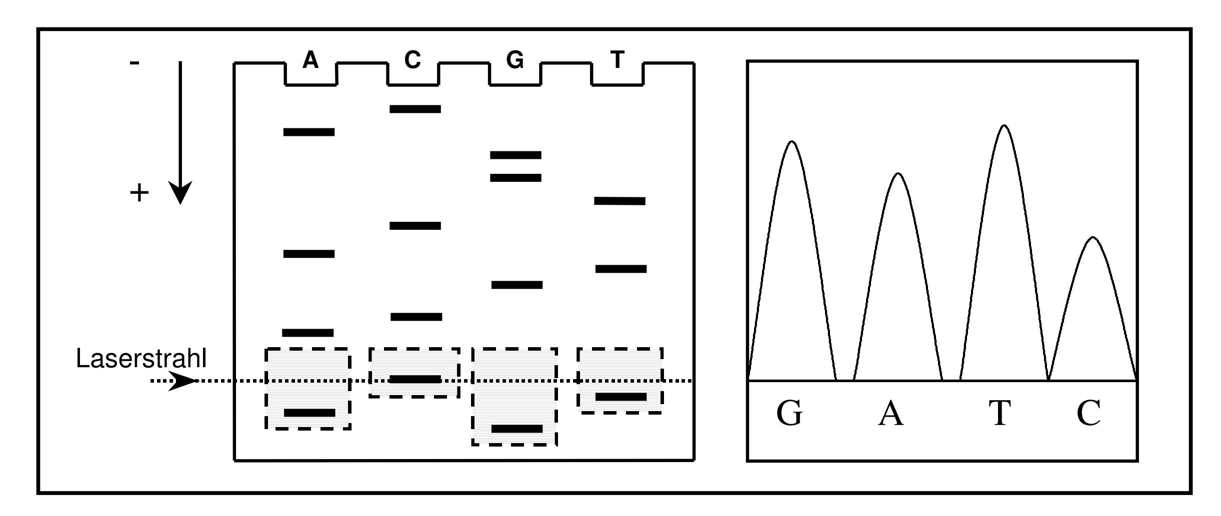



**Abbildung 2.6** Laserdetektion und computerunterstützte Datenverarbeitung

jeweils eines der zugefügten ddNTP befindet. Entsprechend der statistischen Verteilung entspricht die Kollektion der Fragmentlängenunterschiede der Menge des entsprechenden Nukleotids in der Basenfolge. Die Fragmente aller vier Reaktionsgemische wird elektrophoretisch aufgetrennt. Aufgrund der unterschiedlichen Laufgeschwindigkeit der Fragmente entsprechend ihrer Länge kann man auf die Position der Basen im Matrizen-Strang schließen. Während man in der klassischen Form die aufgetrennten Basen anfärbt (z.B. autoradiographisch mit [α-$^{35}$S]dNTP oder [α-$^{32}$P]dNTP) und die Basensequenz entgegen der Laufrichtung abliest (Abbildung 2.5), entfällt die Färbung bei

modernen Sequenzierern, da diese die Bande mit Hilfe eines fixen Rotlichtlasers beim Vorbeilaufen detektieren (Abbildung 2.6). Der Computer erstellt im Folgenden eine graphische Darstellung der Basensequenz.

### 2.7.2 Material

#### 2.7.2.1 Geräte

- Sequencer ALF®express (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
  Elektrophorese-Set: Heizplatte (standard), Glasplatte (standard), Spacer (0,5 mm), Kamm (0,5 mm)
- Software AM V3.0 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
  Software ALFwin v1.10 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- MicroSpin™ S-300 HR Columns Kat. Nr. 27-5130-01 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- Sterilfilter Kat. Nr. 16534 (Fa. Sartorius, Göttingen)

#### 2.7.2.2 Chemikalien

- Amoniumpersulfat (APS) Kat. Nr. A-3678 (Fa. Sigma, Deisenhofen)
- SequaGel-6™ Kat. Nr. 900610 (Fa. Biozym, Hess. Oldendorf)
  6% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid 19:1
  0,1 M Tris-Borat
  2 mM ETDA, pH 8,3
  8,3 M Harnstoff
  TEMED
- Thermo Sequenase fluorescent labelled primer sequencing kit with 7-deaza-dGTP
  Kat. Nr. RPN 2538 (Amersham Life Science, Braunschweig) beinhaltet
  Reagenz A: ddATP, Tris-HCl pH 9,5, Magnesiumchlorid, Tween™ 20, Nonidet™ P-40, 2-Mekaptoethanol, dATP, dCTP, dTTP, 7-deaza-dGTP, thermostabile Pyrophosphatase, Thermo Sequenase DNA Polymerase

| | |
|---|---|
| Reagenz C | ddCTP, Tris HCl pH 9,5, Magnesiumchlorid, Tween™ 20, Nonidet™ P-40, 2-Mekaptoethanol, dATP, dCTP, dTTP, 7-deaza-dGTP, thermostabile Pyrophosphatase, Thermo Sequenase DNA Polymerase |
| Reagenz G | ddGTP, Tris HCl pH 9,5, Magnesiumchlorid, Tween™ 20, Nonidet™ P-40, 2-Mekaptoethanol, dATP, dCTP, dTTP, 7-deaza-dGTP, thermostabile Pyrophosphatase, Thermo Sequenase DNA Polymerase |
| Reagenz T | ddTTP, Tris HCl pH 9,5, Magnesiumchlorid, Tween™ 20, Nonidet™ P-40, 2-Mekaptoethanol, dATP, dCTP, dTTP, 7-deaza-dGTP, thermostabile Pyrophosphatase, Thermo Sequenase DNA Polymerase |
| Formamid loading dye | Formamid, EDTA, Methylviolett |

- Oligonukleotid-Primer (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- DEPC-$H_2O$
- TBE-Puffer 0,6x

### 2.7.3 Durchführung

In der vorliegenden Arbeit wurden all die Patientenproben sequenziert, die in der vorangegangenen SSCP-Analyse durch abberante Bandenmuster auffielen. Die Sequenzierung besteht aus drei Arbeitsschritten: 1. PCR mit Sequenz-Primern, 2. DNA-Aufarbeitung und Cycle-Reaktion und 3. Sequenzierung.
Am Anfang steht die PCR mit den in Abschnitt 2.7.1 beschriebenen modifizierten Sequenz-Primern. Dabei wird die doppelte Menge an DNA verwendet, um genügend Material für die Sequenzierung zu gewinnen. Da die optimalen Bedingungen je nach Primer unterschiedlich sind, sind diese vorher

durch Probe-PCRs auszutesten und anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese zu kontrollieren.
Im 2. Schritt wird die DNA gewaschen. Dazu werden die MicroSpin-Säulen abzentrifugiert und das in einem Eppendorf-Hütchen aufgefangene Zentrifugat verworfen. Anschließend wird die DNA auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert. Die gereinigte DNA wird bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.
Für die Cycle-Reaktion wird der Ansatz zusammenpipettiert, der sich für jeden zu amplifizierenden Strang wie folgt zusammensetzt:

| | |
|---|---|
| 19,8 µl | DEPC-$H_2O$ |
| 4,4 µl | gewaschene DNA |
| 2,2 µl | Forward (P 172)- bzw. Reverse (M 13)-Primer |

Die für den Kettenabbruch notwendigen dd-Nukleotide (2 µl pro Nukleotid pro Strang) werden vorgelegt und jeweils 6 µl des Ansatzes beigefügt. In jedem Röhrchen sind somit die Nukleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP und entsprechend dem gewählten Reagenz ddATP, ddCTP, ddGTP bzw. ddTTP. Die Reaktionsgemische werden einer definierten Sequenz-Reaktion zugeführt, bei der zu Anfang 3 Minuten bei 95°C denaturiert wird. In den sich anschließenden 26 Zyklen wird zuerst für 30 Sekunden bei 95°C denaturiert und anschließend für 30 Sekunden die Temperatur bei 65°C zum Annealing, d.h. zum Anlagern der dd-Nukleotide gehalten. Am Ende der Cycle-Reaktion werden die Proben auf 4°C heruntergekühlt und mit zum endgültigen Abbruch der Reaktion 4 µl Formamid loading dye versetzt.
Im dritten Schritt wird zunächst die Sequenzplatte mit Ethanol gereinigt und alle Unreinheiten sorgfältig entfernt, da diese den Lauf erheblich behindern. Die Kammer wird zusammengesetzt und das Gel hergestellt. Dazu werden in einem Messbecher 48 ml Sequagel 6% und 12 ml Complete Buffer zusammengebracht und auf einem Magnetrührer auf kleinster Stufe durchmischt. Dem Ganzen werden 490 µl APS beigefügt. Nach 1 Minute wird das noch flüssige Gel mit Hilfe einer Spritze zwischen die beiden Platten der Kammer gegossen, wobei auf Luftblasenfreiheit zu achten ist. Das Gel wird für 2 Stunden zum Polymerisieren zur Seite gestellt.

Nach dem Aushärten wird der Laufpuffer hergestellt. Dazu gibt man 120 ml TBE 10x ad 2 Liter Milli-Q-Wasser. Die Gelkammer wird in den Sequenzierer eingehängt und der Laufpuffer eingefüllt.
Unmittelbar vor dem Beschicken der Geltaschen werden diese mit Puffer gespült. Sind alle Proben aufgetragen, werden die Kathode und Anode angeschlossen und die Sequenzierung gestartet. Die Trennung der Fragmente erfolgt dann über 700 Minuten bei 1500 V, 38 mA, 34 W und 50°C. Die Detektion der Fragmente mittels eines Rotlichtlasers wird computerunterstützt aufgezeichnet.

### 2.7.4 Auswertung

Die Auswertung der Sequenzierung erfolgt mit Hilfe der AM V3.0 bzw. ALFwin v1.10 Software, mit der sich die Rohdaten erfassen, analysieren und prozessieren lassen. Die Fragmentreihen werden automatisch ineinander integriert, sodass eine fortlaufende Sequenz entsteht.
Diese Sequenzen werden nun mit der Originalsequenz verglichen. Diese wurde vorher mit einer Wildtyp-Sequenz abgeglichen, was zur Vermeidung methodischer Fehler notwendig ist. Homozygote Mutationen lassen sich folgendermaßen erkennen: Deletionen und Insertionen führen zu einer Verschiebung des Leserasters, d.h. zu einem so genannten Frame-shift gegenüber der Originalsequenz. Während bei einer Deletion eine oder mehrere Basen in der Sequenz fehlen, kommen diese bei einer Insertion hinzu. Bei Punktmutationen in Form eines Basenaustausches findet sich eine andere Base als an entsprechender Stelle der Originalsequenz. Heterozygote Mutationen zeigen ein anderes Erscheinungsbild, da hierbei zwei unterschiedliche Allele vorliegen. Bei einer Mutation kommt es zu einer Überlagerung zweier Kurven in der graphischen Darstellung, da die eine das von der Mutter, die andere das vom Vater vererbte Allel zeigt. Im Falle einer Deletion und Insertion ist ab der Stelle der Mutation das Leseraster uneinheitlich verschoben, d.h., dass von da an zwei Kurven sichtbar sind. Bei einem einfachen Basenaustausch kommt es lediglich an einer Stelle dieser

Sequenz zur Überlagerung. Abbildung 2.7 zeigt die graphische Darstellung der DNA nach vorangegangener Sequenzierung. Um festzustellen, von welchem Elternteil die Mutation vererbt worden ist, wird in einer weiteren Sequenzierung die mütterliche und väterliche DNA untersucht. Bei einer homozygoten Mutation beim Kind ist somit zu erwarten, dass beide Elternteile, sofern diese phänotypisch gesund sind, heterozygote Träger dieser Mutation sind. Zeigt sich beim Kind eine heterozygote Mutation, lässt dies darauf schließen, dass nur ein Elternteil heterozygot für diese Mutation ist. Wegen des vorliegenden autosomal-rezessiven Erbgangs muss in diesem Fall bei dem Kind eine weitere Mutation in einem anderen Abschnitt des Gens vorliegen und gesucht werden.

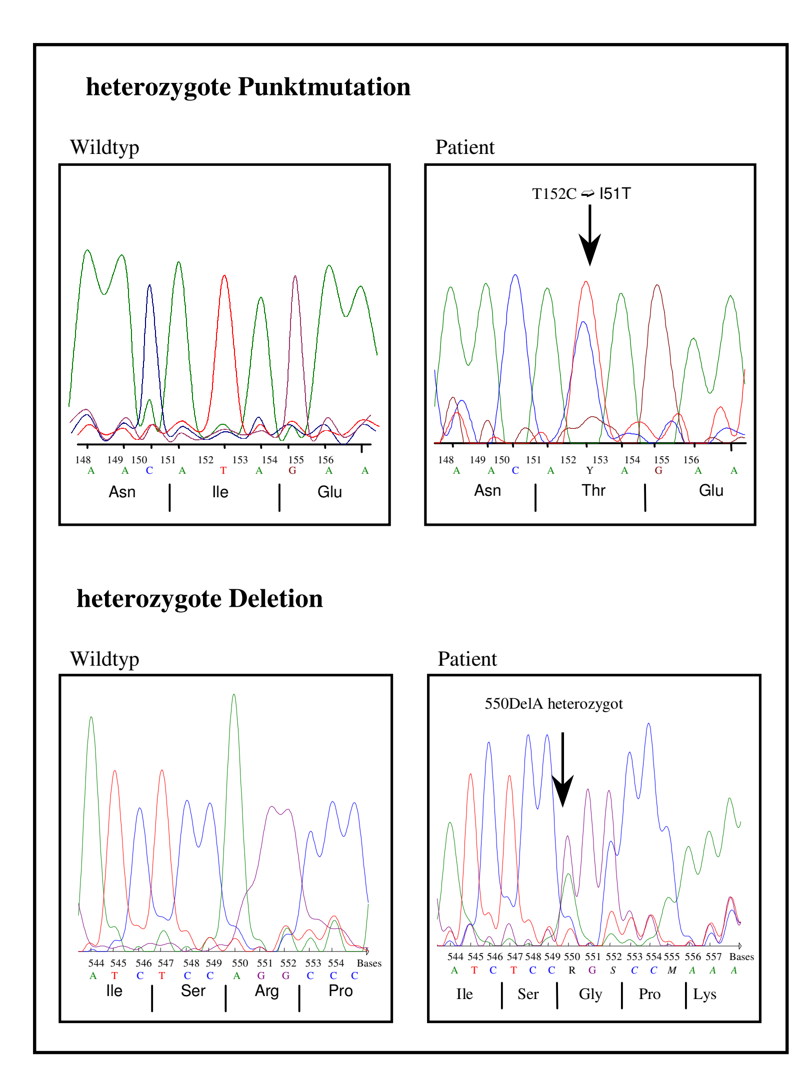



**Abb. 2.7** Graphische Darstellung von Mutationen nach DNA-Sequenzierung am Beispiel einer Punktmutation und Deletion

# 3 Ergebnisse

## 3.1 Mutationsanalyse

### 3.1.1 Untersuchung des ROMK-Gens (*KCNJ1*)

#### 3.1.1.1 Allgemeines

Dieses Gen wurde bei allen Patienten untersucht, ausgenommen denen, bei denen eine Mutation im ClC-Kb gefunden wurde.
Die SSCP-Analysen wurden bei zwei Temperaturen (4 und 15°C) durchgeführt, um die Sensitivität der Methode zu erhöhen. Untersucht wurden sämtliche Exone des ROMK, d.h. die Exone 1 – 4 und das Exon 5, unterteilt in 6 PCR-Fragmente. Obwohl die Exone 1 und 3 keine kodierenden Sequenzen enthalten, weiß man inzwischen, dass insbesondere das Exon 1 Transskriptionselemente enthält, welche für die Bildung der Isoformen 2-5 von entscheidender Bedeutung sind (Näheres siehe Abschnitt 4.1). Daher ist es möglich, dass eine Mutation in diesem Bereich ebenfalls zu einer Veränderung

**Tabelle 3.1** Primer Sequenzen für die SSCP-Analyse im ROMK-Gen (5`-3`)

| Primer Name | Exon | Forward-Primer | Reverse-Primer |
|---|---|---|---|
| ROMK Ex 1 | 1 | CACGCCTACTCTTGTTGGAT | CGTGGAAAAGAGGTCTAAAT |
| ROMK Ex 2 | 2 | TTACCTTCACCCAAATGTCTT | CGTCTATGCACCAAATCTGT |
| ROMK Ex 3 | 3 | GTGGGCCTGTCCTCTGTCTC | AGCCTGGGGTGTCCAATAGT |
| ROMK Ex 4 | 4 | CACAAATTAGCGTCAGTCCAC | AACATTATCTGCCTGGCTTTC |
| ROMK Ex 5.1 | 5 | GCTACCGTTTTGCTCCCATA | GACTTTGCTTTACTCCCGTTG |
| ROMK Ex 5.2 | 5 | CTTATTGGCAGTCACATTTAT | TATTTCCCTTCCTTTGTCTT |
| ROMK Ex 5.3 | 5 | GGATATGGATTCAGGTGTGTG | TTCAGGAGTGACTGTGGTCTT |
| ROMK Ex 5.4 | 5 | AAGTGGAGATACAAAATGACCA | AAGCAGAAAAATGGCAGTG |
| ROMK Ex 5.5 | 5 | ATCAGGGTGTTGACAGAAA | GGAGGTCTTTGTGAATGTA |
| ROMK Ex 5.05 | 5 | TTCATGTGGGTCACCTAGTTC | CCTCCACATTGCCAAATTCT |

des Kanals und damit verbunden zu einer Funktionsänderung führt. Alle Patientenproben, die im SSCP ein aberrantes Bandenmuster aufwiesen, wurden zur weiteren Charakterisierung sequenziert. Die verwendeten Primersequenzen zeigt Tabelle 3.1. Die verwendeten Sequenz-Primer tragen zusätzlich zu der unten gezeigten Sequenz eine Folge von 20 Basenpaaren, an den der Universal-Fluoreszenz-Primer binden kann. Die Sequenz dieses Abschnittes ist in Tabelle 2.2 dargestellt.

#### 3.1.1.2 Ergebnisse der Mutationssuche

Bei der Mutationssuche im ROMK konnten insgesamt 19 relevante Mutationen charakterisiert werden. Eine genauere Übersicht gibt Abbildung 3.1:

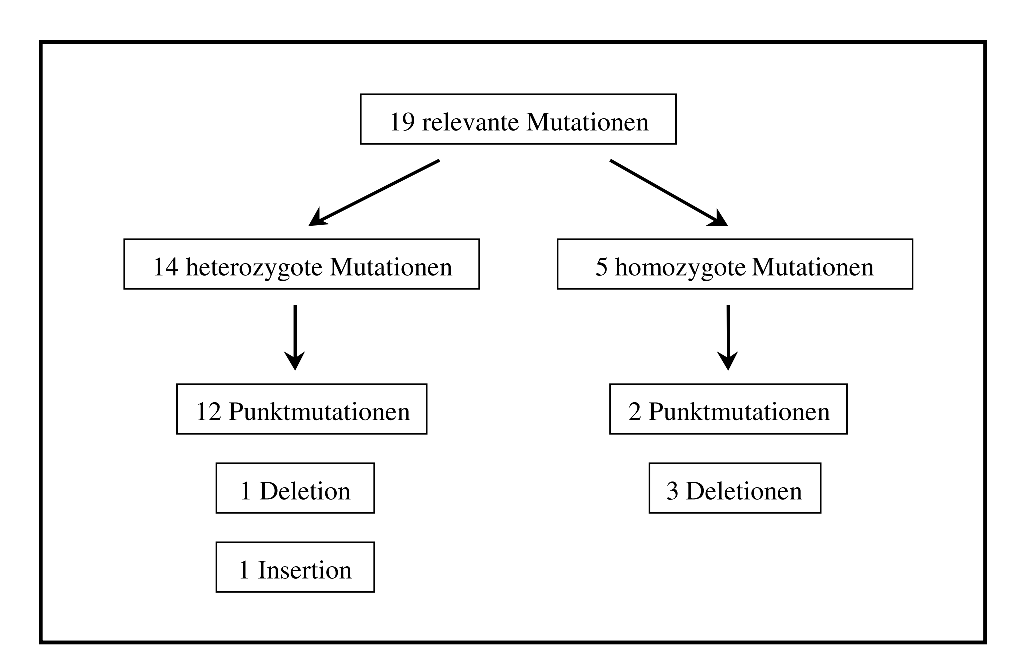



**Abbildung 3.1** Gliederung der relevanten Mutationen im ROMK

Bei den Punktmutationen handelt es sich um Substitutionsmutationen, die Bereiche innerhalb der Aminosäuresequenz verändern, die bei Mensch, Ratte und Xenopus laevis konserviert sind. Insertionen bzw. Deletionen führen zu einer Verschiebung des Leserasters. Zudem fanden sich einige Polymorphismen, d.h. Punktmutationen, die zwar zu einer Änderung der Aminosäuresequenz führen, dabei die Kanalfunktion allerdings nicht beeinträchtigen (siehe auch Abschnitt 2.6.4). Ferner zeigten einige Patienten so

genannte stumme Mutationen. Dabei handelt es sich um Punktmutationen, bei denen eine Basensubstitution stattfindet, das neu entstandene Basen-Triplett allerdings für die gleiche Aminosäure kodiert und es daher zu keiner Strukturveränderung des Kanals kommt.

Eine Übersicht über die klinischen Patientendaten und die Ergebnisse der Mutationsanalyse geben die Tabellen 3.2 und 3.3.

**Tabelle 3.2** Klinische Daten der Patienten mit identifizierter ROMK-Mutation

| | Phänotyp | Polyhydramnion | Gestationsalter (SSW) | Alkalose | Hypokaliämie | Hyperkalziurie | Nephrokalzinose |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Marb. 7023 | HPS | + | 30 | + | + | + | + |
| Marb. 7399 | HPS | + | 29 | - | + | + | + |
| Marb. 7419 | HPS | + | 36 | + | - | + | + |
| Marb. 7422 | HPS | + | 32 | + | + | + | + |
| Marb. 7451 | HPS | + | 30 | + | + | + | + |
| Marb. 7466 | HPS | + | 30 | + | + | + | + |
| Marb. 7467 | HPS | + | 32 | + | + | + | + |
| Marb. 7486 | HPS | + | 33 | + | + | + | + |
| Marb. 7522 | HPS | + | 34 | - | + | + | + |
| Paris P 81 | HPS | + | ø bekannt | + | + | + | + |
| Paris P 89 | HPS | + | 36 | + | + | + | + |
| Nijmeg. N 1 | HPS | + | ø bekannt | + | + | + | + |

Ohne Indometacin-Therapie: Alkalose bei einem Serum-Bikarbonat > 26 mmol/l; Hypokaliämie bei einem Serum-Kalium < 3,3 mmol/l; Hyperkalziurie bei einer Nierenausscheidung > 0,5 mmol/mmol Kreatinin; Nephrokalzinose bei sonographischem Nachweis

**Tabelle 3.3** Übersicht über gefundene ROMK-Mutationen bei HPS-Patienten (Die in Zahlen angegebene Lokalisation der Mutation ist durch die Position des Methionins in der cDNA an Position 1/AS 1 definiert.)

| | ethnische Herkunft | # | Exon | Mutation | Nukleotid | Konsequenz | Homozygotie |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Marb. 7419 | Türkei | 1 | 5.1 | R368Stop(opal) | 1053DelAAAG | trunkiertes Protein | + |
| Marb. 7023 | Deutschl. | 2 | 5.1 | P362stop(ochre) | 1116InsC | trunkiertes Protein | - |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Marb. 7023 | Deutschl. | 3 | 5.2 | V315G | T1001G | Aminosäuren -Substitution | - |
| Marb. 7399 | Österreich | 4 | 5.2 | F325C | T1031G | Aminosäuren -Substitution | - |
| Marb. 7399 | Österreich | 5 | 5.2 | R311Q | G989A | Aminosäuren -Substitution | - |
| Marb. 7451 | Türkei/ Schweiz | 6 | 5.2 | R311W | C988T | Aminosäuren -Substitution | - |
| Marb. 7451 | Türkei/ Schweiz | 7 | 5.3 | L220F | C715T | Aminosäuren -Substitution | - |
| Marb. 7466 | Deutschl. | 8 | 5.4 | I142T | T482C | Aminosäuren -Substitution | - |
| Marb. 7466 | Deutschl. | 9 | 5.4 | P110L | C386T | Aminosäuren -Substitution | - |
| Marb. 7467 | Albanien | 10 | 5.5 | K45E | A190G | Aminosäuren -Substitution | + |
| Marb. 7486 | Italien | 11 | 5.5 | I51T | T209C | Aminosäuren -Substitution | - |
| Marb. 7486 | Italien | 12 | 5.5 | C49Y | G203A | Aminosäuren -Substitution | - |
| Marb. 7422 | Türkei | 13 | 1 u. 2 | kompl. Del. | kompl. Del. | fehlendes Protein | + |
| Marb. 7522 | Türkei | 14 | 1 u. 2 | kompl. Del. | kompl. Del. | fehlendes Protein | + |
| Paris P 89 | ø bekannt | 15 | 5.2 | V315E | T1001G | Aminosäuren -Substitution | + |
| Paris P 81 | ø bekannt | 16 | 5.2 | L297S | T947C | Aminosäuren -Substitution | - |
| Paris P 81 | ø bekannt | 17 | 5.3 | V199stop(opal) | 607DelA | trunkiertes Protein | - |
| Nijmeg. N 1 | Schweiz | 18 | 5.2 | R324L | G1028T | Aminosäuren -Substitution | - |
| Nijmeg. N 1 | Schweiz | 19 | 5.2 | L320P | T1016C | Aminosäuren -Substitution | - |

Zu jeder relevanten ROMK-Mutation der Kinder wurde, soweit Material vorhanden war, eine Mutationsanalyse bei den zugehörigen Eltern durchgeführt, um die Herkunft der Mutation zu sichern bzw. eine Spontanmutation auszuschließen. Im Folgenden werden die Ergebnisse

beschrieben und die Befunde der SSCP-Analyse und der Sequenzierung dargestellt:

**Marb. 7419:**

Die betroffene Patientin hat blutsverwandte Eltern. Beide sind klinisch gesund, aber Träger der heterozygoten Deletion 1053DelAAAG im Exon 5.1, die sie an die Tochter weitergeben und die bei dieser als homozygote Mutation erscheint (siehe Abbildung 3.2).

**Marb. 7023:**

Bei diesem Patienten konnte im Rahmen der Mutationsanalyse eine heterozygote Mutation im Exon 5.1 gezeigt werden. Dabei handelt es sich um die Insertion eines Cytosins (1116InsC). Dies hat die Bildung eines vorzeitigen Stop-Codons an Position 362 zur Folge. Die Durchführung der Familienanalyse zeigt, dass die genannte Mutation vom Vater an seinen Sohn vererbt wurde. In Abbildung 3.3 ist die Mutation dargestellt. Bei der zweiten Mutation handelt es sich um eine Punktmutation (V315G) im Exon 5.2. Diese Mutation wurde von der Mutter an ihren Sohn weitergegeben (siehe Abbildung 3.4).

**Marb. 7399:**

Bei dem betroffenen Patienten konnten im Exon 5.2 zwei heterozygote Mutationen entdeckt werden, von denen jeweils eine von der Mutter und vom Vater stammt. Beide Eltern sind phänotypisch gesund. Die Mutation F325C wurde im Rahmen der Familienanalyse bei der Mutter gefunden, die Mutation R311W beim Vater. Bei beiden liegt die Mutation heterozygot vor (siehe Abbildung 3.5 und 3.6).

**Marb. 7451:**

Die Patientin ist Trägerin zweier heterozygoter Mutationen. Die Mutation R311W liegt im Exon 5.2 und wurde von der Mutter als heterozygote Trägerin an die Tochter weitergegeben. Die Mutation L220F stammt vom Vater, der ebenfalls heterozygoter Träger ist (siehe Abbildung 3.7 und 3.8). Beide Eltern sind klinisch gesund.

**Marb. 7466:**

Bei dieser Patientin konnten im Exon 5.4 zwei heterozygote Mutationen gezeigt werden. Bei beiden handelt es sich um die Punktmutationen P110L und I142T. Da keine DNA der Eltern vorliegt, ist die Durchführung einer Familienanalyse nicht möglich gewesen. Die Abbildungen 3.9 und 3.10 geben eine Übersicht.

**Marb. 7467:**

Im Rahmen der Mutationssuche wurde bei diesem Patienten eine homozygote Mutation im Bereich des Exon 5.5 entdeckt. Die konsanguinen Eltern (DNA liegt nicht vor), die phänotypisch beide gesund sind, sind beide Träger der heterozygoten Mutation K45E und haben das kranke Allel an ihren Sohn weitervererbt, bei dem die Mutation dann homozygot auftritt (siehe Abbildung 3.11).

**Marb. 7486:**

Diese Patientin zeigt zwei heterozygote Mutationen im Exon 5.5. Während der Vater als heterozygoter Träger die Mutation I51T an seine Tochter weitergegeben hat, stammt die Mutation C49Y von der Mutter, bei der diese ebenfalls heterozygot vorliegt. Beide Eltern sind phänotypisch gesund (siehe Abbildung 3.12 und 3.13).

**Marb. 7422:**

Bei diesem Patienten fehlen im Bereich des Exon 1 und 2 die Banden sowohl in der Agarose-Gelelektrophorese als auch im SSCP. Alle anderen Exone ließen sich hingegen darstellen. Es liegt daher eine homozygote Deletion der gesamten Exone 1 und 2 vor (siehe Abbildung 3.14).

Um auszuschließen, dass eine Mutation im Bereich der Primer-Bindungsstelle liegt, wurden Primer designed, die an unterschiedlichen Stellen binden. In keinem Fall zeigte sich in der Agarose-Gelelektrophorese eine Bande.

Eine genaue Identifikation der Bruchstelle steht noch aus. Die konsanguinen Eltern des Patienten sind phänotypisch gesund.

**Marb. 7522:**

Dieser Patient fiel ebenfalls durch das vollständige Fehlen von Banden im

Bereich der Exone 1 und 2 auf. Auch in diesem Fall liegt eine homozygote Deletion beider genannten Exone vor (siehe Abbildung 3.15). Die Eltern des Kindes sind konsanguin und phänotypisch gesund.
Die Untersuchung dieser Mutation entspricht der bei Marb. 7422 aufgezeigten.

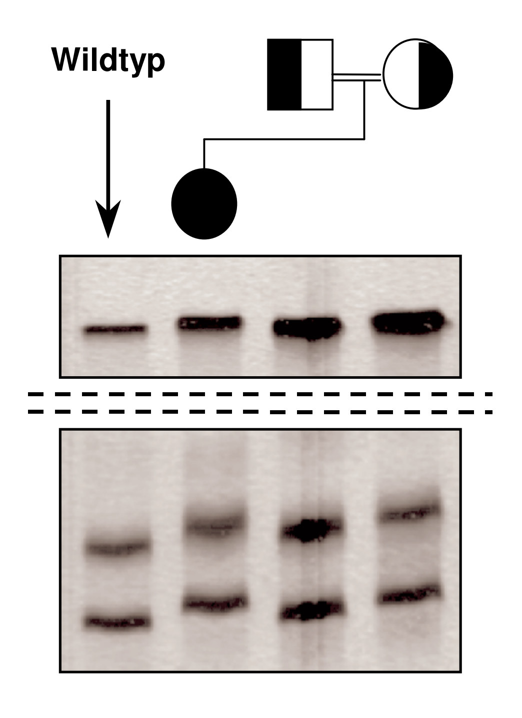
**Paris P 89:**
Diese Patientin zeigt die homozygote Mutation V315E im Exon 5.2. Die blutsverwandten Eltern des Kindes sind beide heterozygote Träger dieser Mutation und haben das kranke Allel an ihre Tochter weitergegeben (siehe Abbildung 3.16). Beide Eltern sind klinisch gesund.

**Paris P 81:**
Bei dieser Patientin konnten zwei heterozygote Mutationen im ROMK nachgewiesen werden. Die Punktmutation L297S im Exon 5.2 stammt von der Mutter, die heterozygote Trägerin dieser Mutation und phänotypisch gesund ist (siehe Abbildung 3.17). Bei der zweiten Mutation handelt es sich um die heterozygote Deletion 607DelA im Exon 5.3 mit der Folge der Entstehung eines Stop-Kodons an Position 199. Diese wurde vermutlich vom Vater vererbt, dessen DNA allerdings nicht vorliegt. Theoretisch kann es sich bei dieser Mutation auch um eine Spontanmutation handeln (siehe Abbildung 3.18).

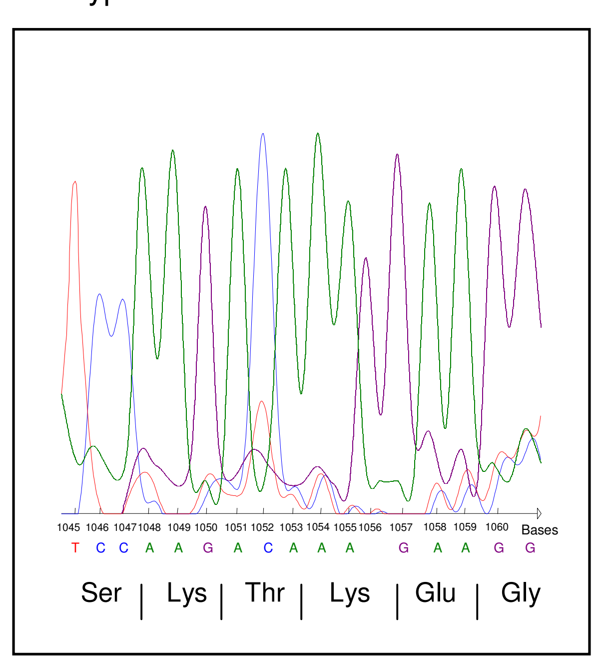
**Nijmeg. N1:**
Dieser Patient zeigt zwei heterozygote Mutationen im Exon 5.2: R324L und L320P (siehe Abbildung 3.19). Da keine elterliche DNA vorliegt, ist eine Familienanalyse zu diesem Zeitpunkt nicht möglich. Eine Konsanguinität der Eltern liegt nicht vor.

# Mutation # 1

**Marb. 7419 ROMK Ex. 5.1**




Wildtyp




Marb. 7419

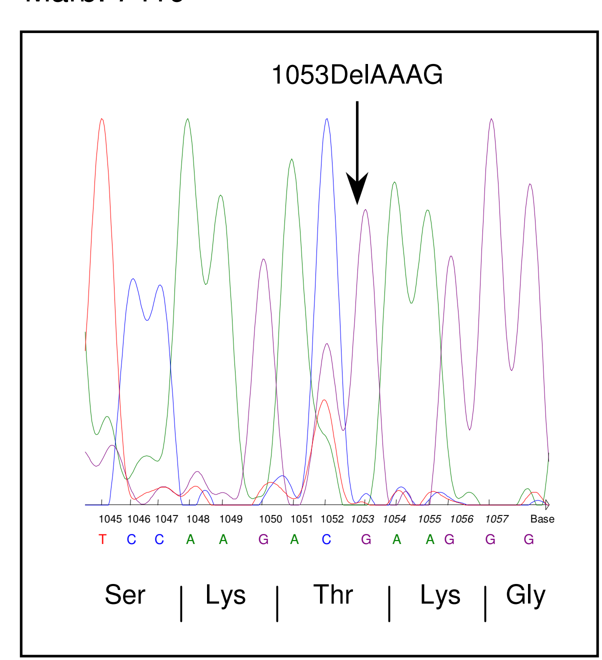
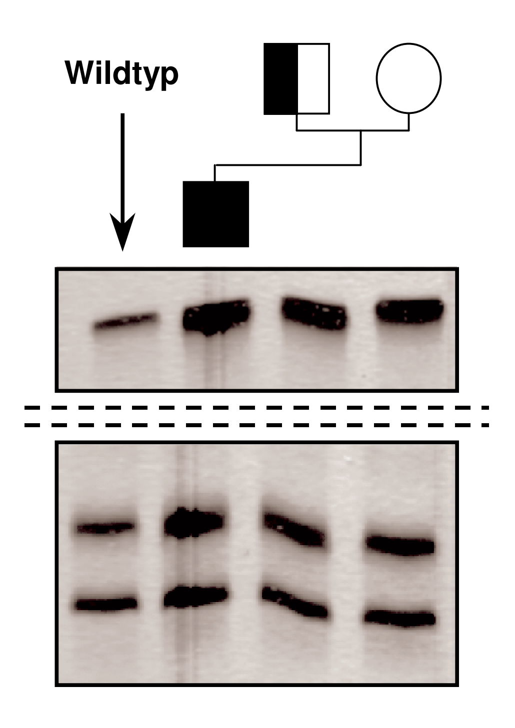


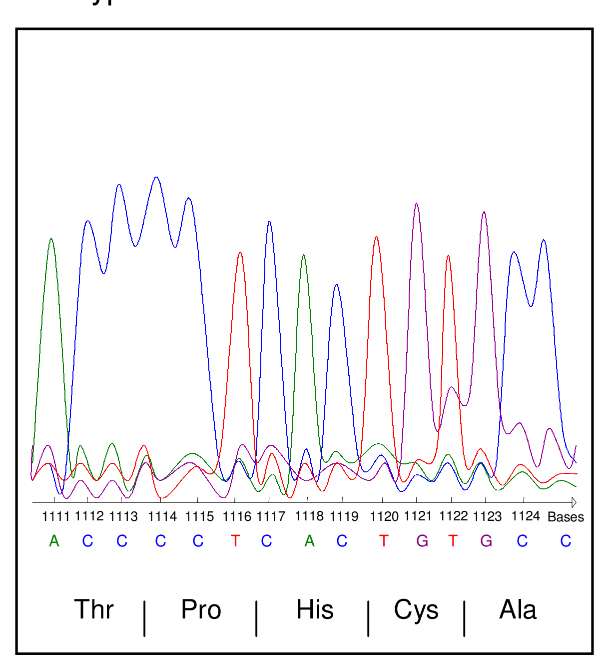

**Abbildung 3.2** Die homozygote Deletion der 4 Basenpaare führt zu einer Verschiebung des Leserasters und damit zu einer Änderung der Aminosäuresequenz mit der Entstehung eines Stop-Kodons an Position 368 (R368Stop(opal)). Das Resultat ist die Entstehung eines trunkierten Proteins.

# Mutation # 2

**Marb. 7023 ROMK Ex. 5.1**




Wildtyp




Marb. 7023

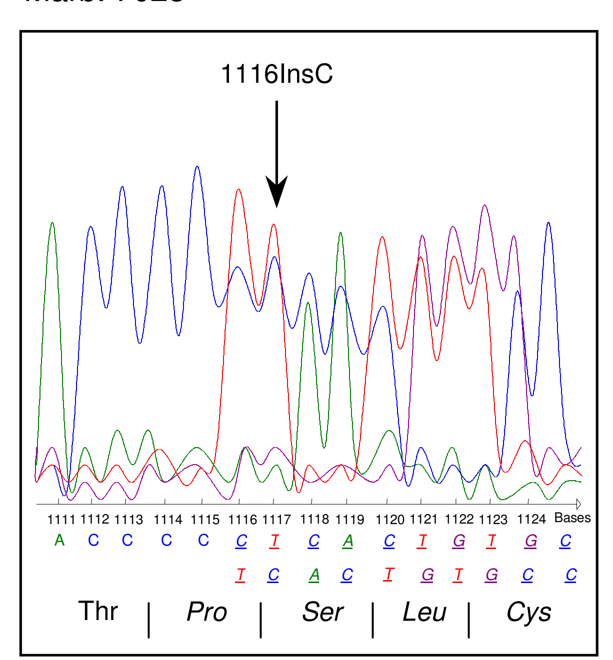
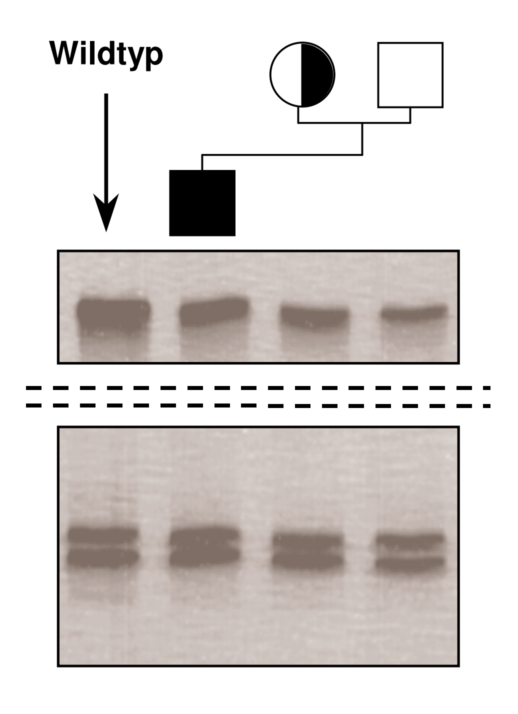


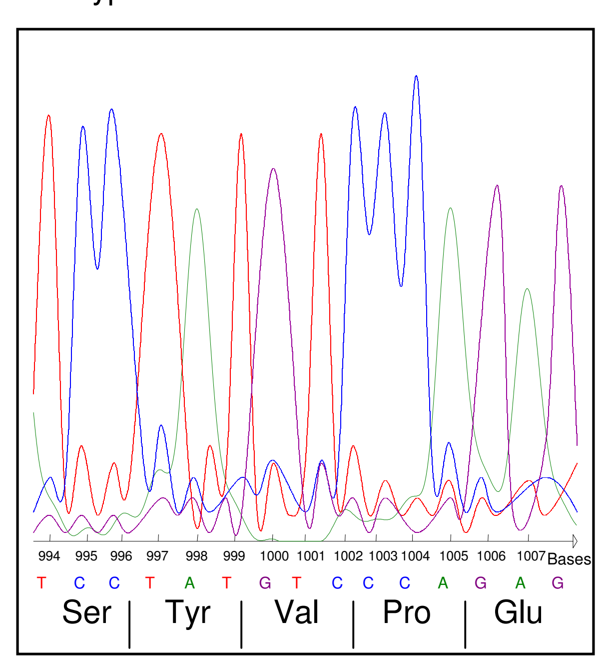

**Abbildung 3.3** Durch die heterozygote Insertion eines Cytosins an Position 1116 verschiebt sich das Leseraster um eine Base.

# Mutation # 3

**Marb. 7023 ROMK Ex. 5.2**




Wildtyp




Marb. 7023

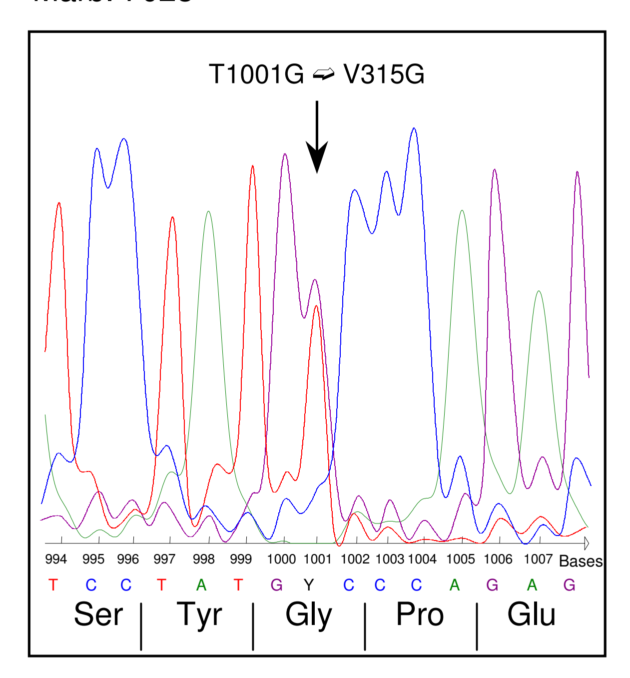
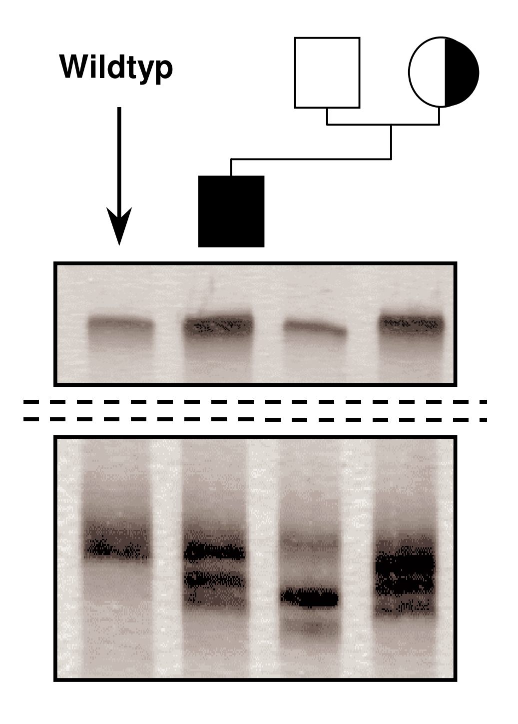


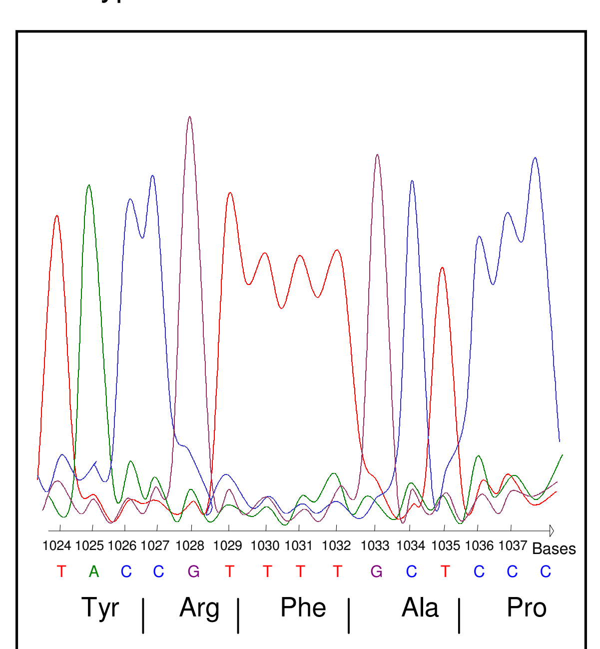

**Abbildung 3.4** Durch den heterozygoten Basenaustausch an Position 315 entsteht in dem Protein anstelle des Valins (Wildtyp) ein Glycin.

# Mutation # 4

**Marb. 7399 ROMK Ex. 5.2**




Wildtyp




Marb. 7399

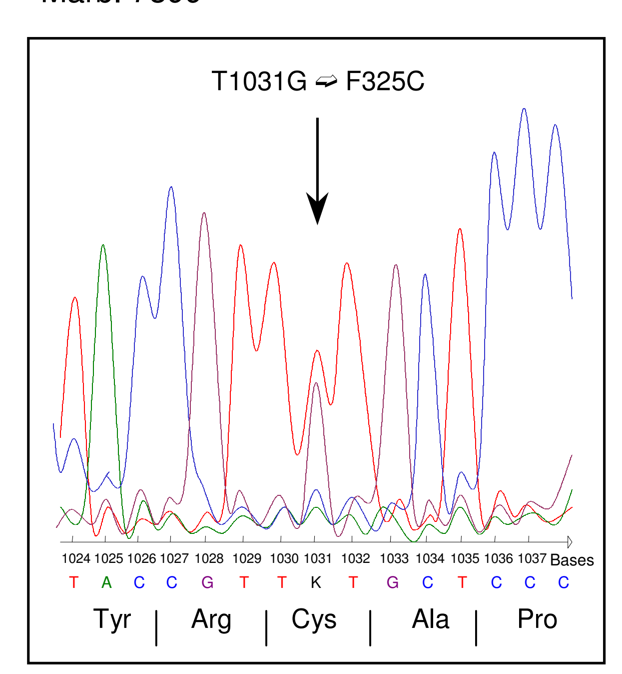
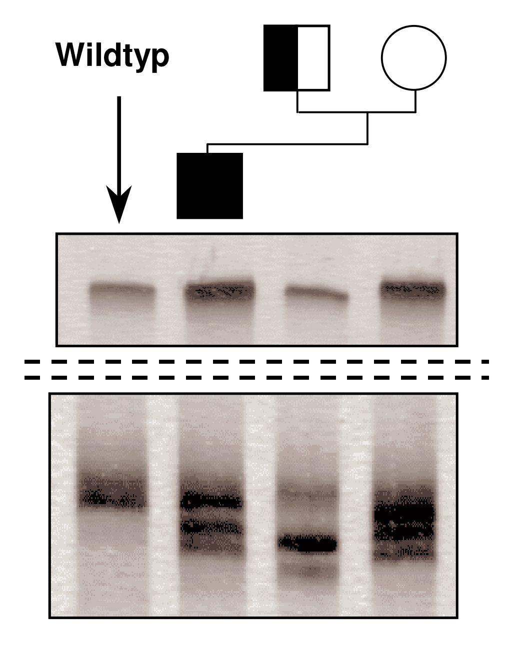


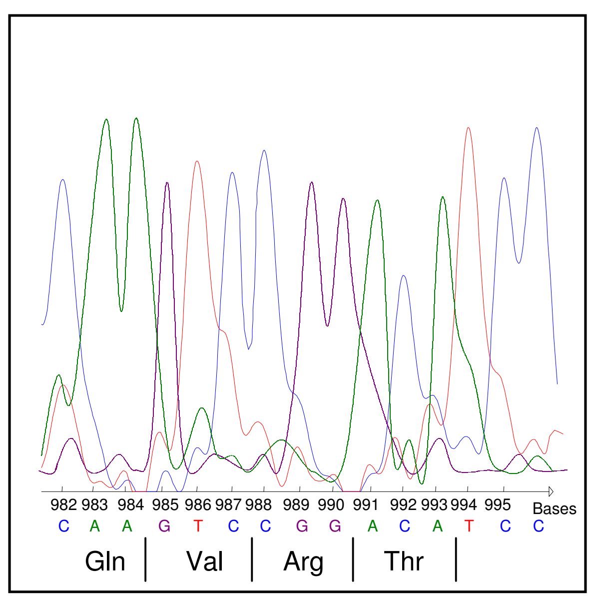

**Abbildung 3.5** Durch den heterozygoten Basenaustausch an Position 1031 entsteht in dem Protein anstelle des Phenylalanins (siehe Wildtyp) ein Cystein.

# Mutation # 5

**<u>Marb. 7399 ROMK Ex. 5.2</u>**




Wildtyp




Marb. 7399

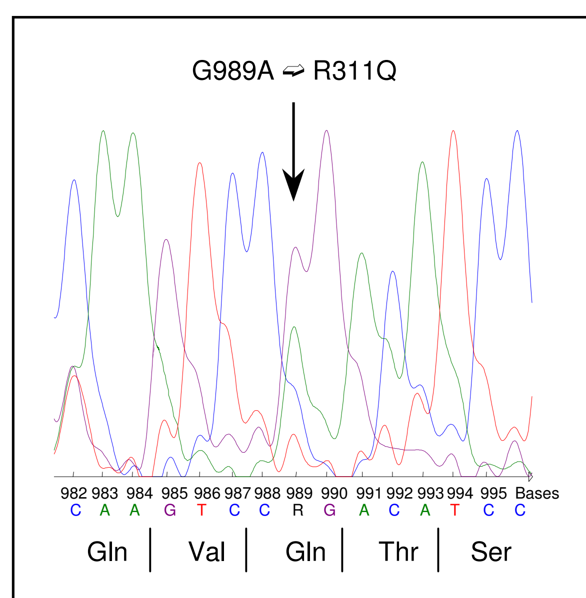
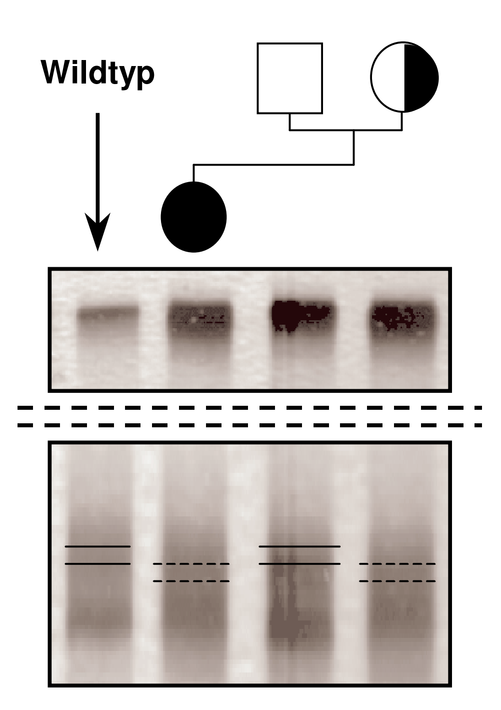



**Abbildung 3.6** Durch den heterozygoten Basenaustausch an Position 989 entsteht in dem Protein anstelle des Arginins (siehe Wildtyp) ein Glutamin.

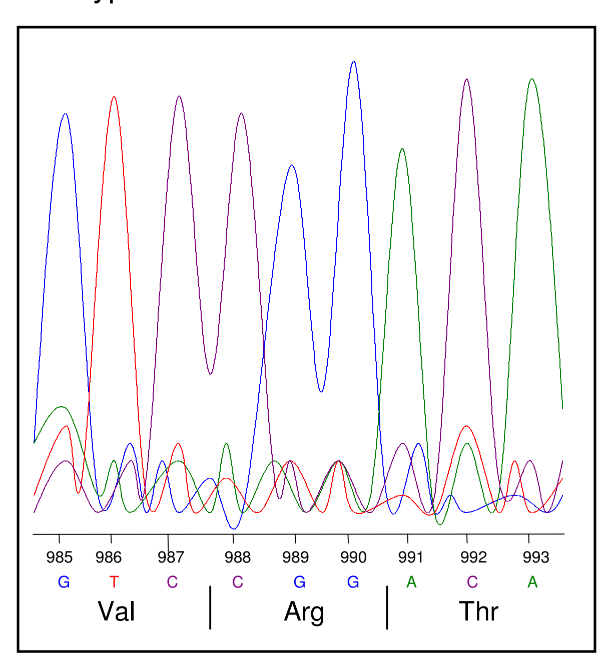
# Mutation # 6

**Marb. 7451 ROMK Ex. 5.2**




**Anmerkung:** Aufgrund der Unschärfe sind die oberen Banden gekennzeichnet.

Wildtyp




Marb. 7451

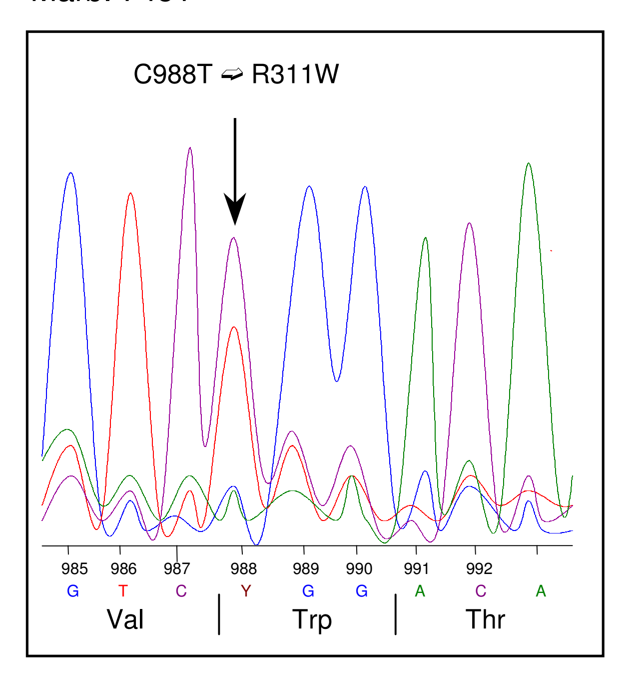
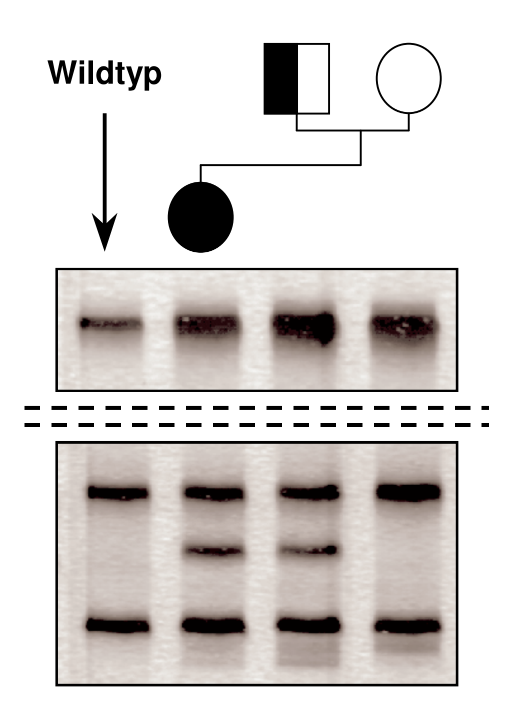


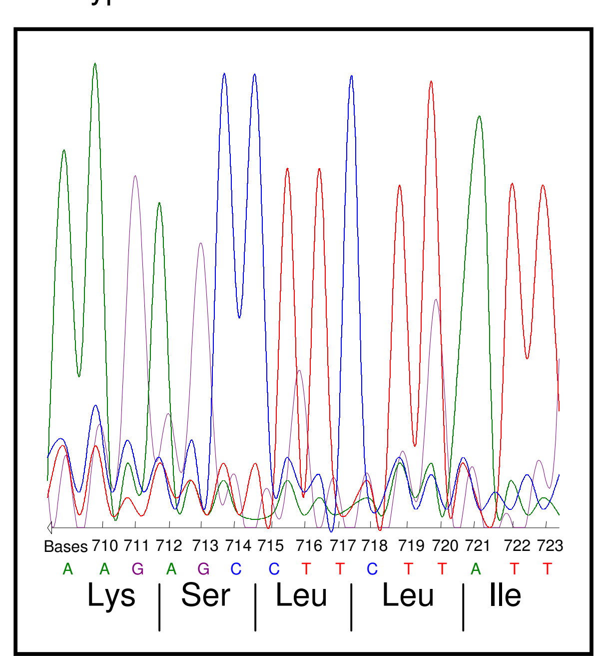

**Abbildung 3.7** Durch den heterozygoten Basenaustausch an Position 988 entsteht in dem Protein anstelle des Arginins (siehe Wildtyp) ein Tryptophan.

# Mutation # 7

**Marb. 7451 ROMK Ex. 5.3**




Wildtyp




Marb. 7451

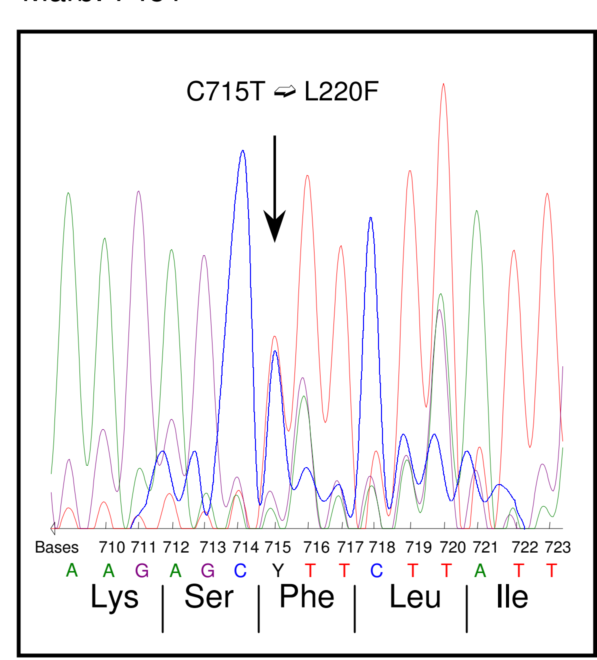
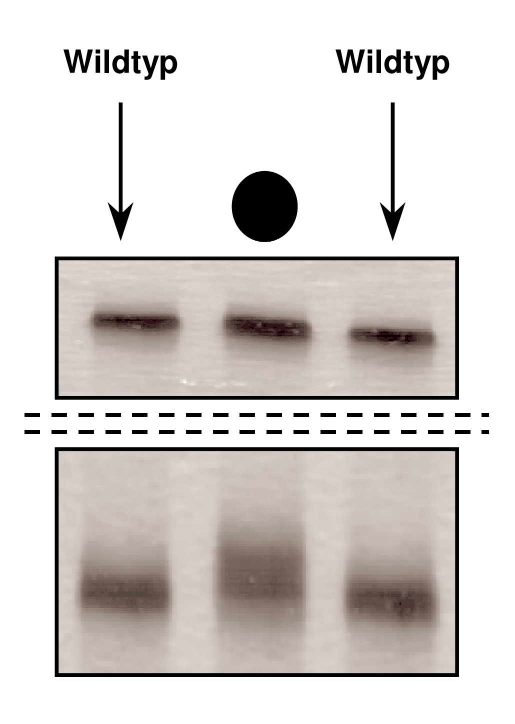


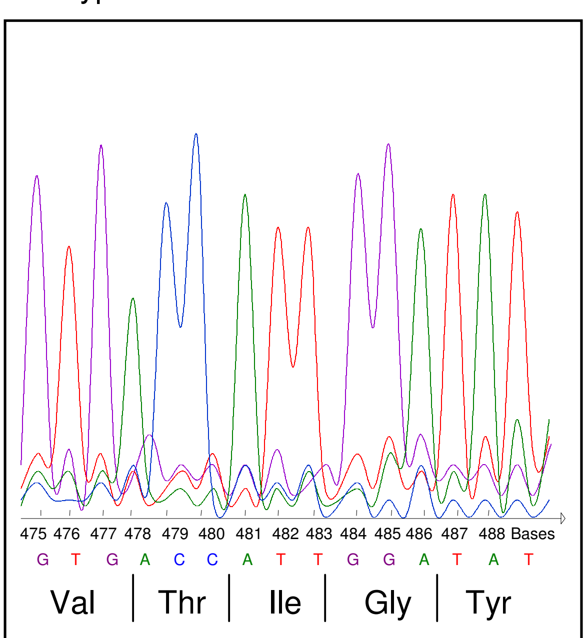

**Abbildung 3.8** Durch den heterozygoten Basenaustausch an Position 715 entsteht in dem Protein anstelle des Leucins (siehe Wildtyp) ein Phenylalanin.

# Mutation # 8

**Marb. 7466 ROMK Ex. 5.4**




Wildtyp




Marb. 7466

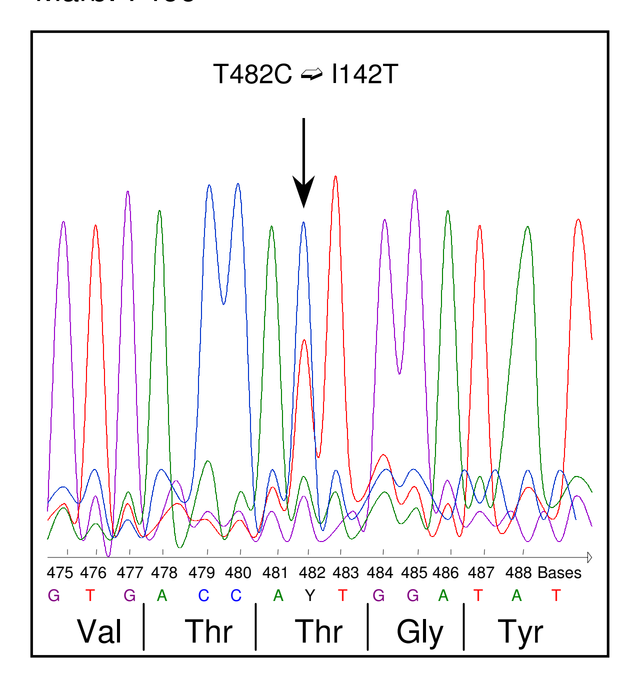
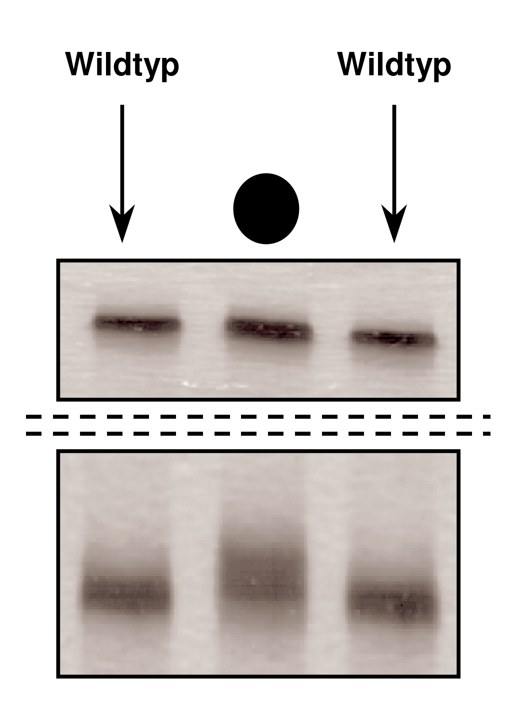


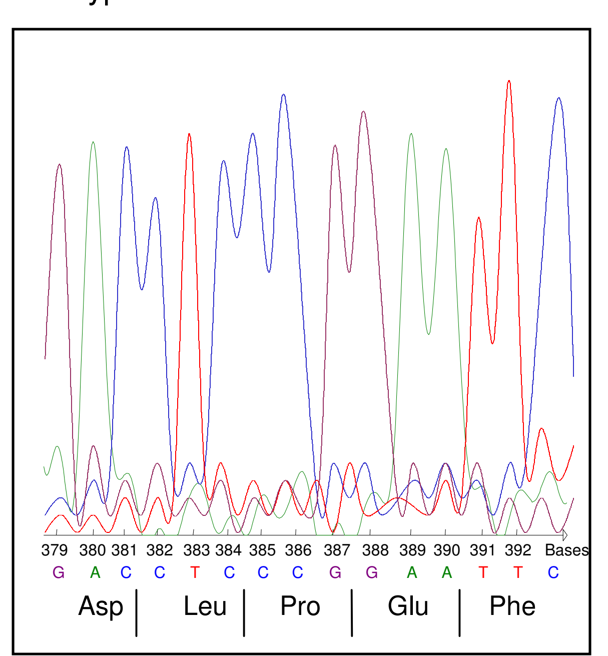

**Abbildung 3.9** Durch den heterozygoten Basenaustausch an Position 482 entsteht in dem Protein anstelle des Isoleucins (siehe Wildtyp) ein Threonin.

# Mutation # 9

**Marb. 7466 ROMK Ex. 5.4**




Wildtyp




Marb. 7466

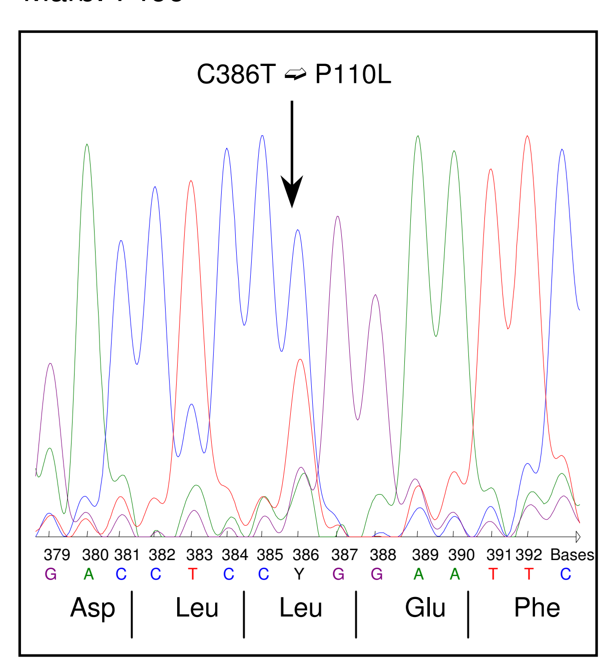
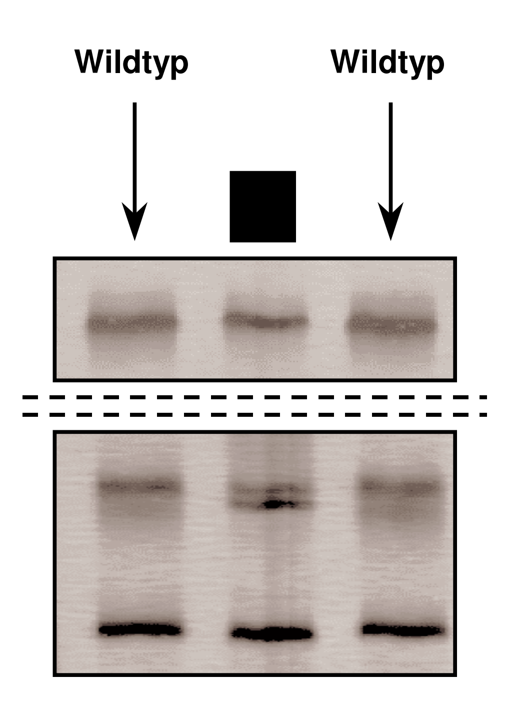


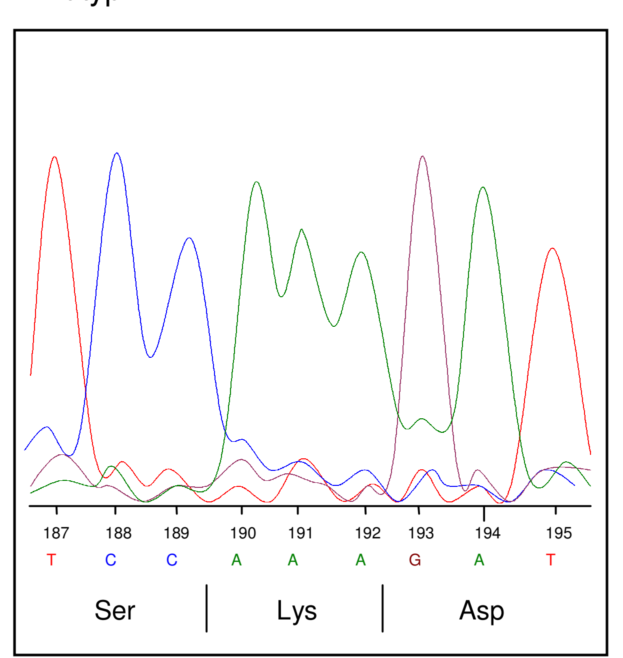

**Abbildung 3.10** Durch den heterozygoten Basenaustausch an Position 386 entsteht in dem Protein anstelle des Prolins (siehe Wildtyp) ein Leucin.

# Mutation # 10

**Marb. 7467 ROMK Ex. 5.5**




Wildtyp




Marb. 7467

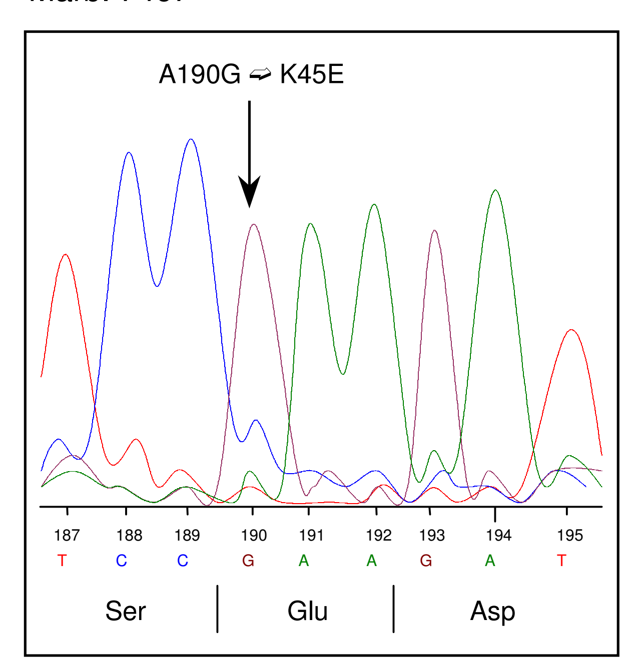
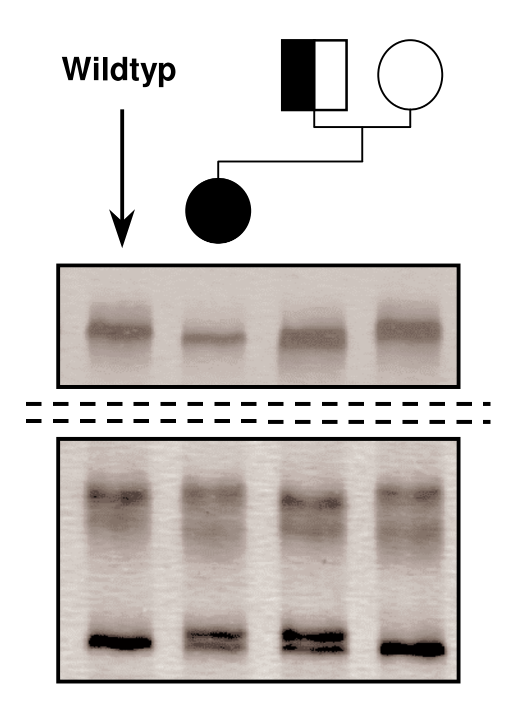


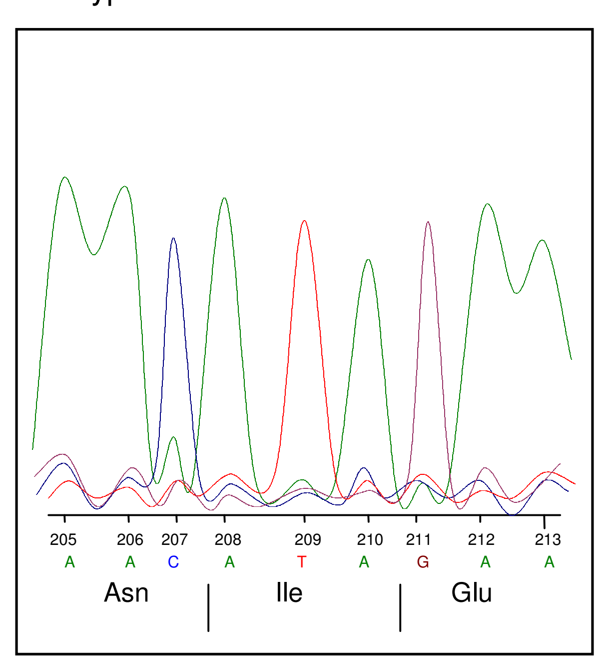

**Abbildung 3.11** Durch den homozygoten Basenaustausch an Position 190 entsteht in dem Protein anstelle des Lysins (siehe Wildtyp) eine Glutaminsäure.

# Mutation # 11

**Marb. 7486 ROMK Ex. 5.5**




Wildtyp




Marb. 7486

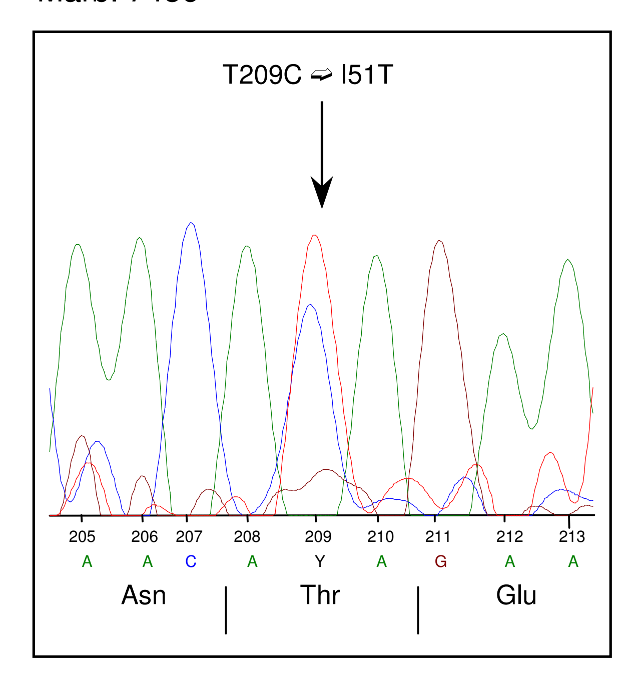
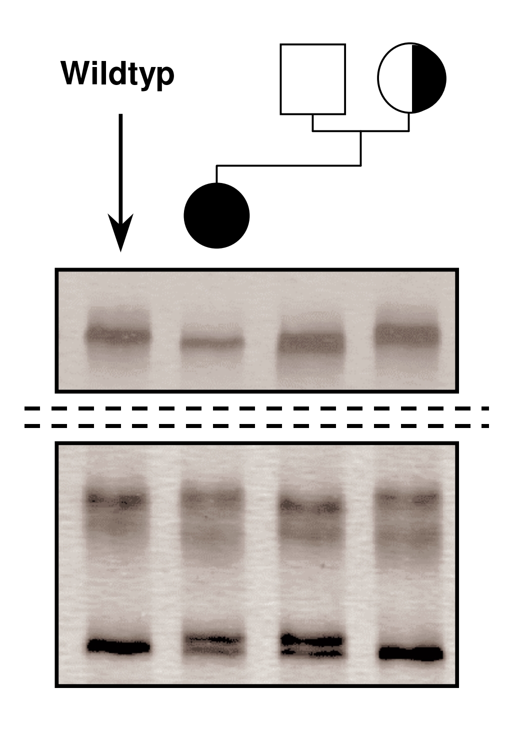


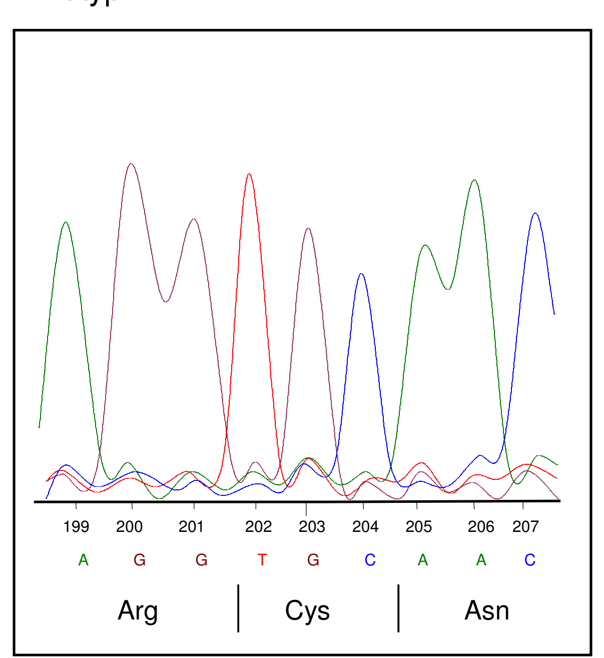

**Abbildung 3.12** Durch den heterozygoten Basenaustausch an Position 209 entsteht in dem Protein anstelle des Isoleucins (siehe Wildtyp) ein Threonin.

# Mutation # 12

**Marb. 7486 ROMK Ex. 5.5**




Wildtyp




Marb. 7486

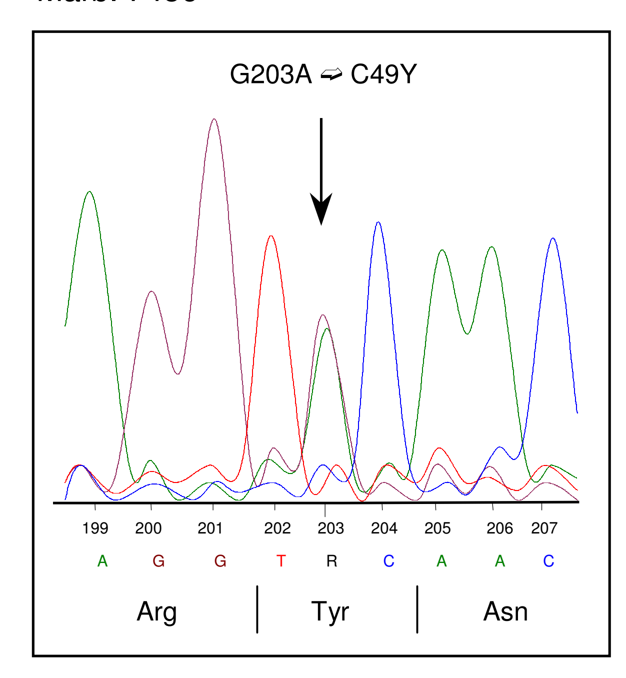
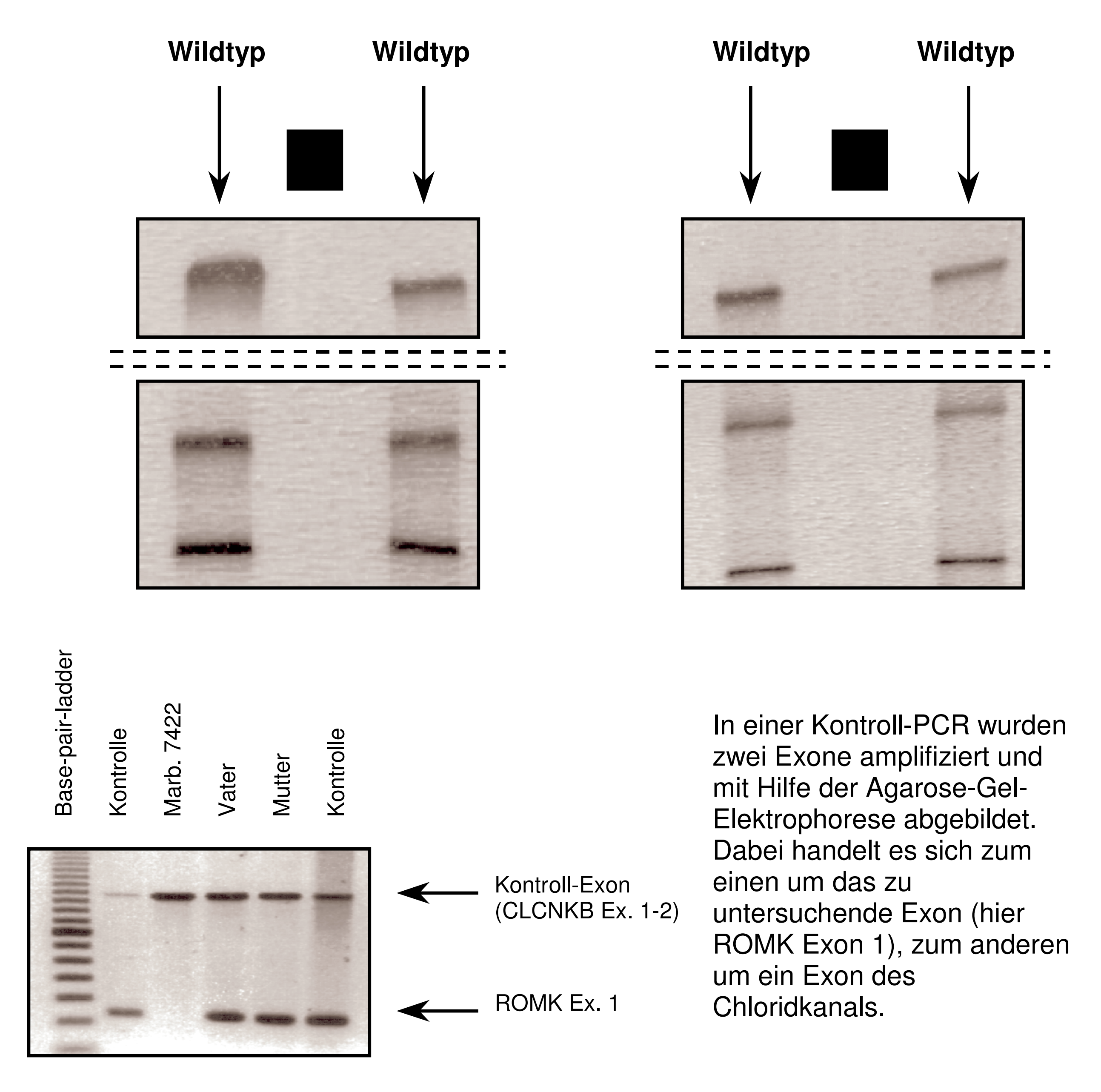



**Abbildung 3.13** Durch den heterozygoten Basenaustausch an Position 203 entsteht in dem Protein anstelle des Cysteins (siehe Wildtyp) ein Tyrosin.

# Mutation # 13

**Marb. 7422 ROMK Ex. 1 und 2**

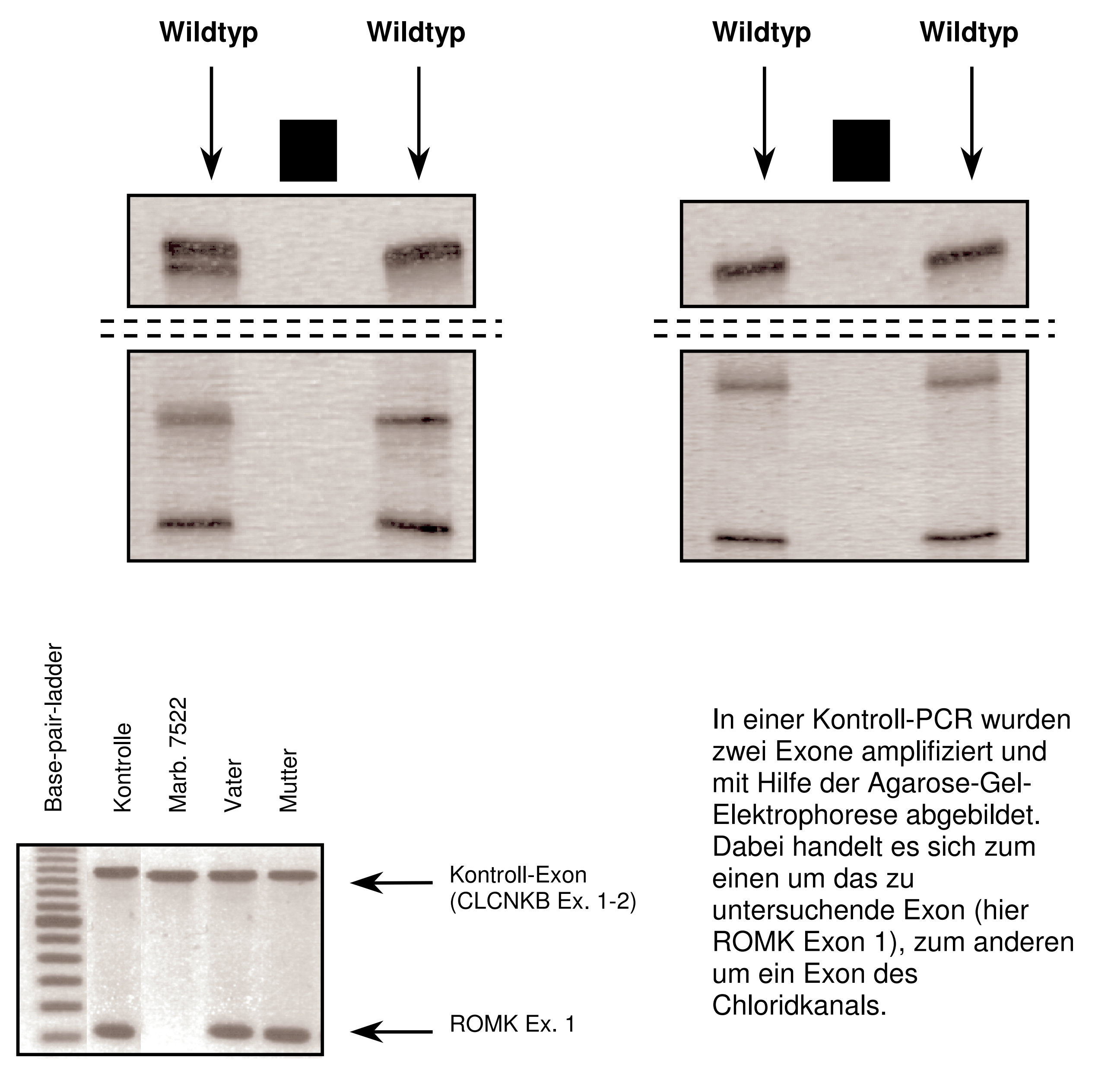



In einer Kontroll-PCR wurden zwei Exone amplifiziert und mit Hilfe der Agarose-Gel-Elektrophorese abgebildet. Dabei handelt es sich zum einen um das zu untersuchende Exon (hier ROMK Exon 1), zum anderen um ein Exon des Chloridkanals.

**Abbildung 3.14** Die homozygote Deletion der Exone 1 und 2 haben das Fehlen des Proteins zur Folge.

# Mutation # 14

**Marb. 7522 ROMK Ex. 1 und 2**

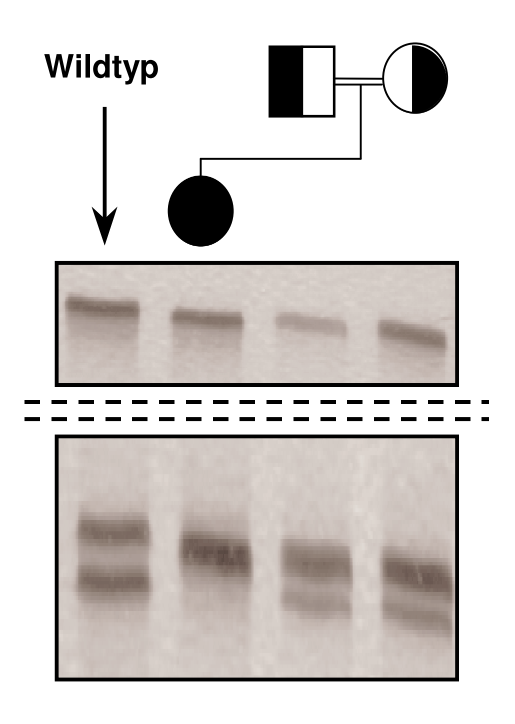



In einer Kontroll-PCR wurden zwei Exone amplifiziert und mit Hilfe der Agarose-Gel-Elektrophorese abgebildet. Dabei handelt es sich zum einen um das zu untersuchende Exon (hier ROMK Exon 1), zum anderen um ein Exon des Chloridkanals.

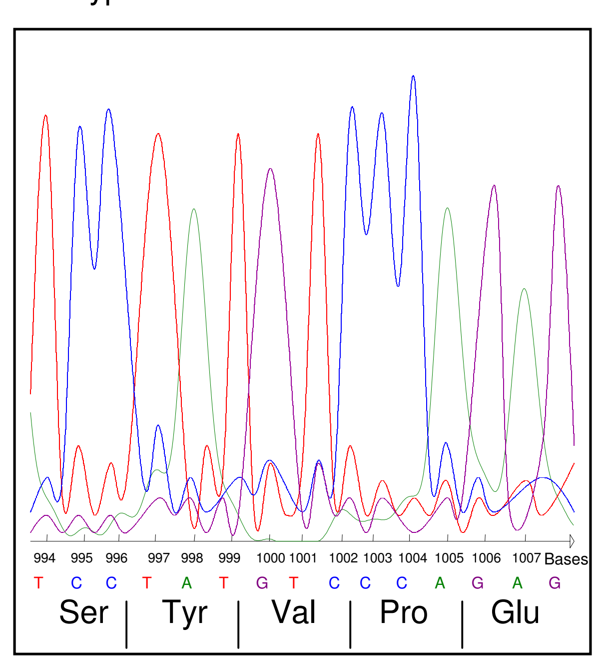
**Abbildung 3.15** Die homozygote Deletion der Exone 1 und 2 haben das Fehlen des Proteins zur Folge.

# Mutation # 15

**Paris P 89 ROMK Ex. 5.2**




Wildtyp




Paris P89

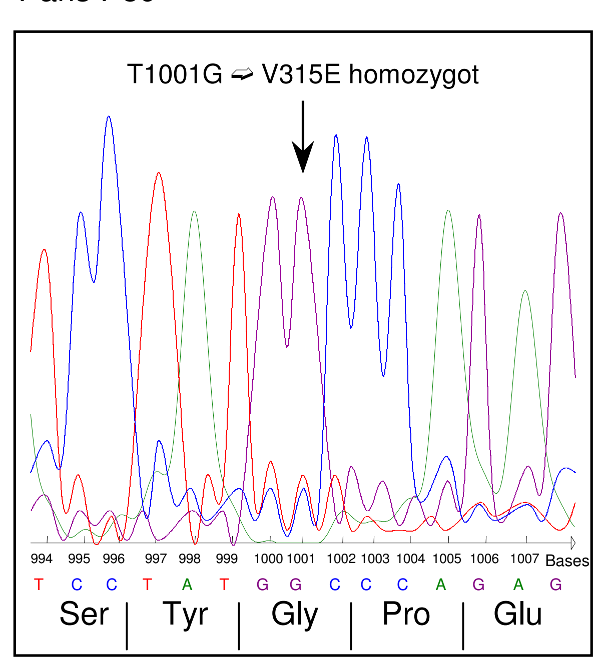
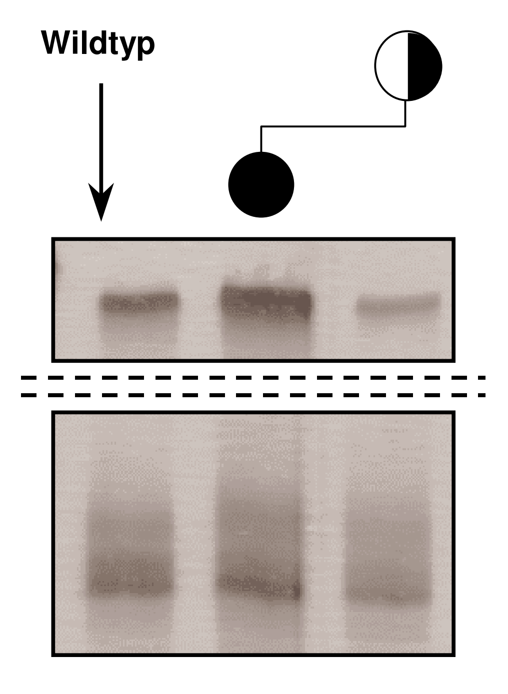



**Abbildung 3.16** Durch den homozygoten Basenaustausch an Position 1001 entsteht in dem Protein anstelle des Valins (siehe Wildtyp) eine Glutaminsäure.

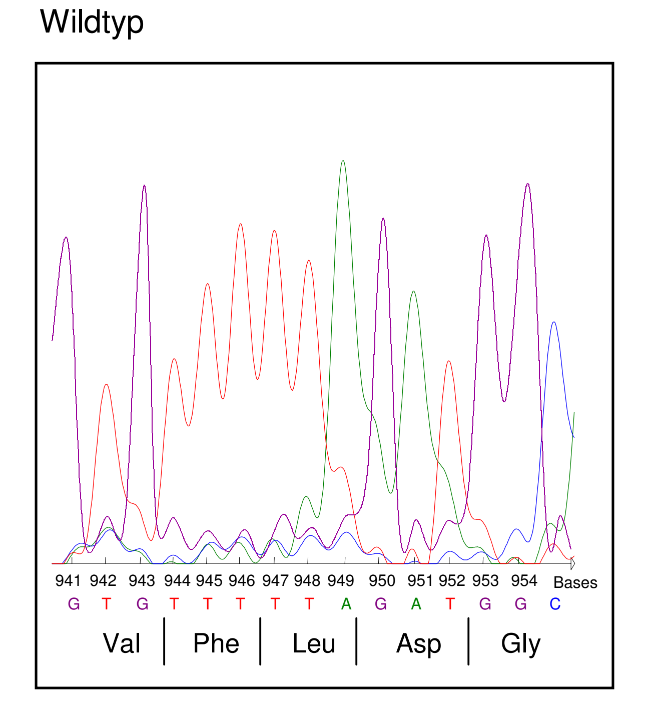
# Mutation # 16

**Paris P 81 ROMK Ex. 5.2**




**Anmerkung:**
Die väterliche DNA liegt nicht vor.

Wildtyp




Paris P81

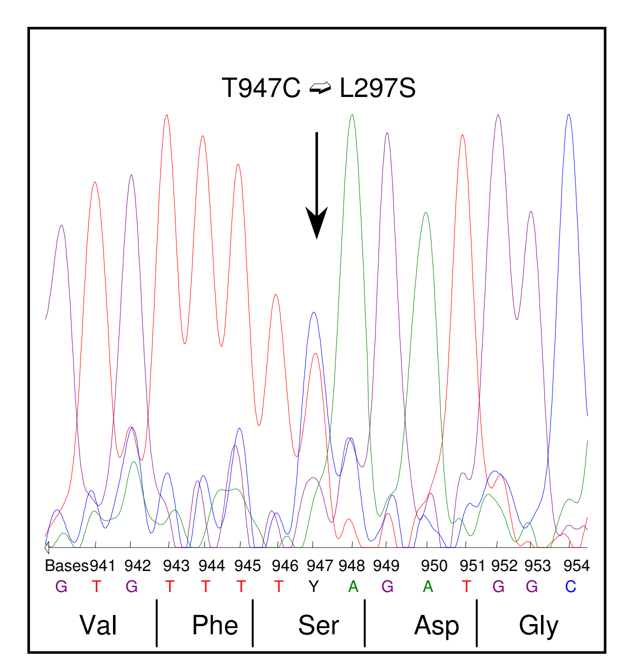
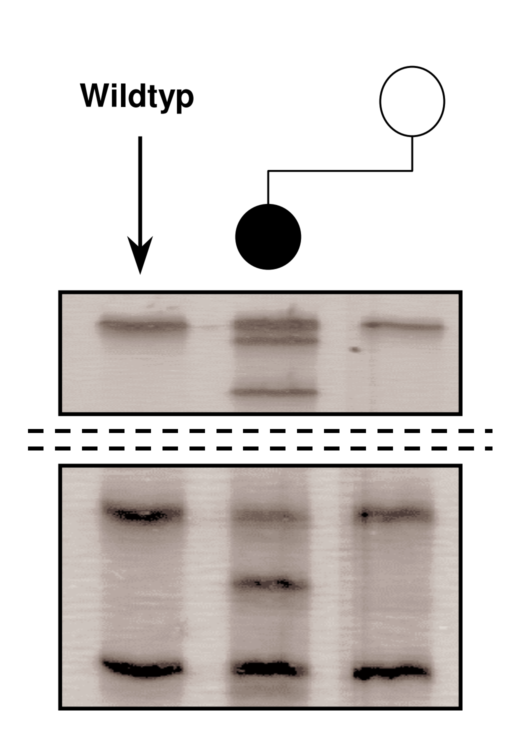



**Abbildung 3.17** Durch den heterozygoten Basenaustausch an Position 947 entsteht in dem Protein anstelle des Leucins (siehe Wildtyp) ein Serin.

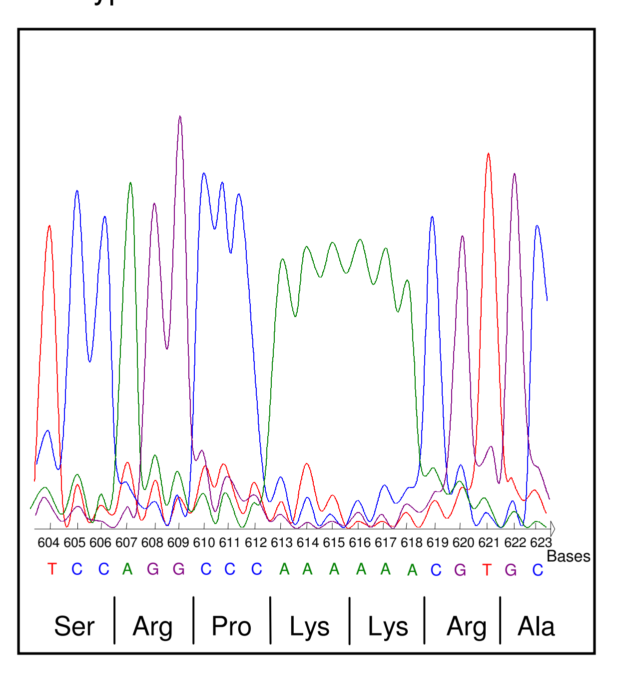
# Mutation # 17

**Paris P 81 ROMK Ex. 5.3**




Die Untersuchung der DNA der Mutter ergibt keine Auffälligkeit. Die Mutation ist damit entweder vom Vater (keine DNA vorhanden) an die Tochter weitergegeben worden oder es handelt sich um eine Spontanmutation.

Wildtyp




Paris P81

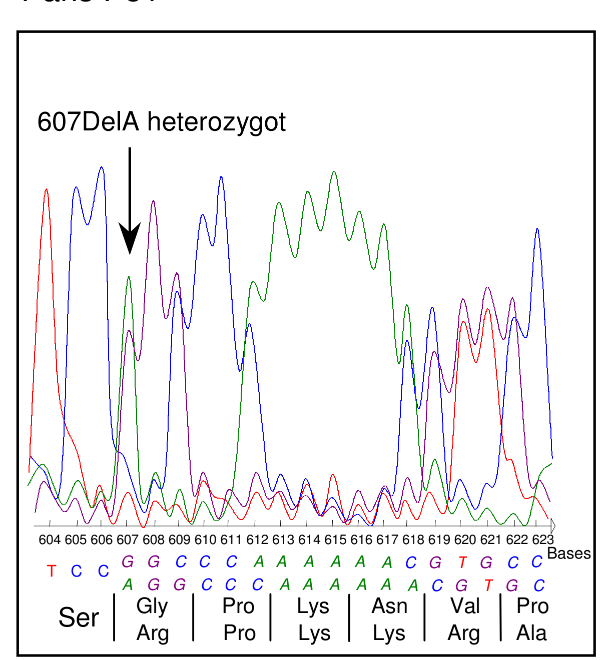
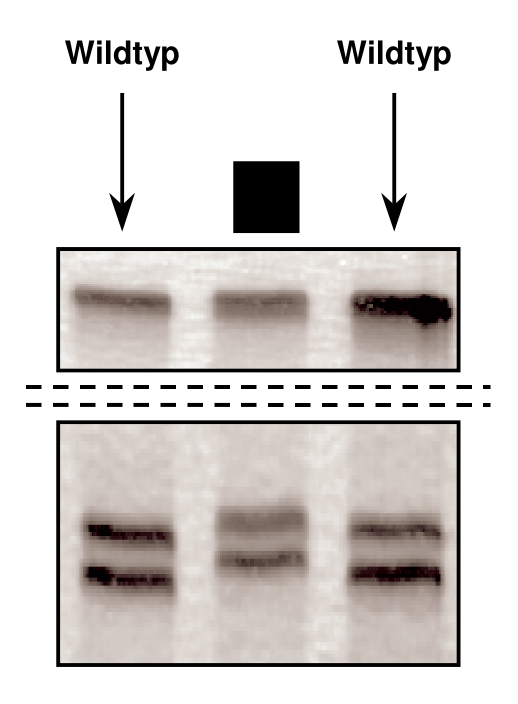
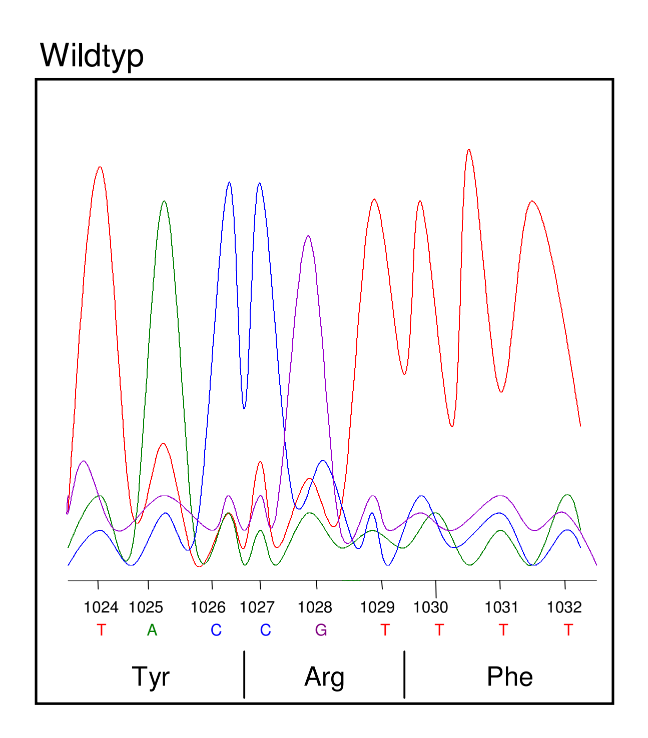



**Abbildung 3.18** Durch die heterozygote Deletion eines Adenosins kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters um eine Base. Das Resultat ist die Entstehung eines Stop-Kodons an Position 199 und somit die Entstehung eines trunkierten Proteins.

# Mutation # 18

**Nijmegen N 1   ROMK Ex. 5.2**



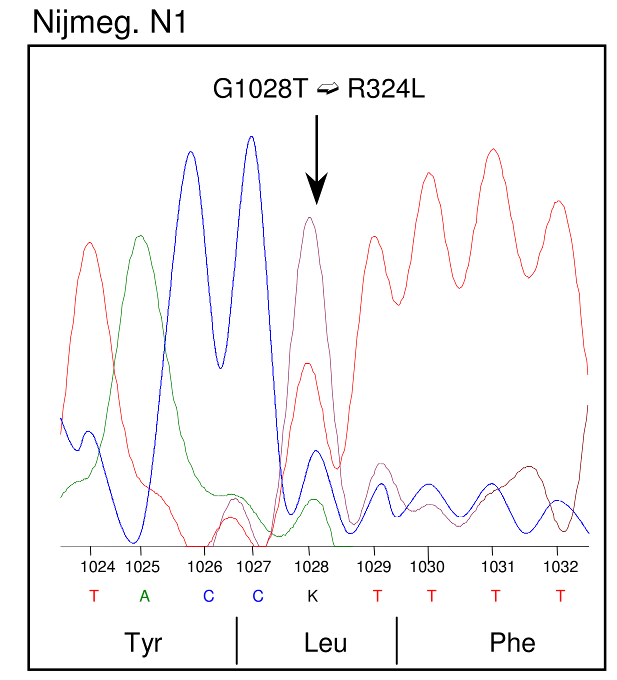
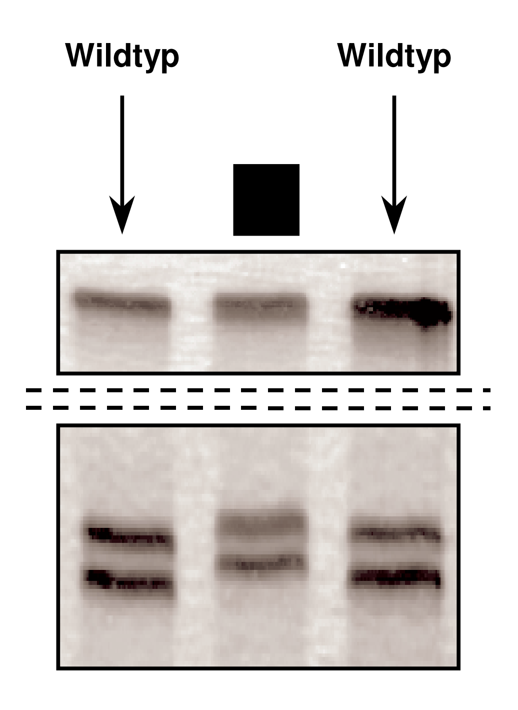




**Abbildung 3.19** Durch den heterozygoten Basenaustausch an Position 1028 entsteht im Protein anstelle des Arginins (siehe Wildtyp) ein Leucin.

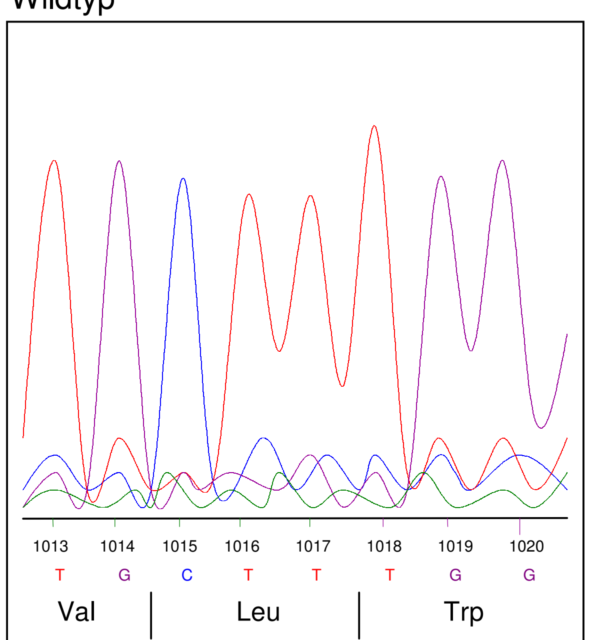
# Mutation # 19

**Nijmegen N 1   ROMK Ex. 5.2**










Nijmeg. N1

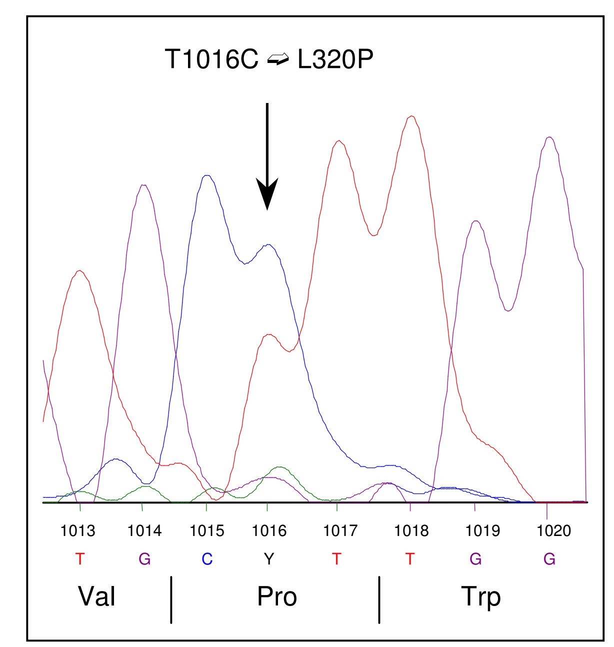



**Abbildung 3.20** Durch den heterozygoten Basenaustausch an Position 1016 entsteht in dem Protein anstelle des Leucins (siehe Wildtyp) ein Prolin.

### 3.1.2 Untersuchung des ClC-Kb-Gens (*ClC-Kb*)

#### 3.1.2.1 Allgemeines

In die Untersuchung dieses Gens wurden all die Patienten aus Tabelle 2.1 eingeschlossen, die sich phänotypisch dem klassischen Bartter-Syndrom zuordnen ließen. Ferner wurden die Patienten untersucht, bei denen entweder keine Mutation im ROMK-Gen gefunden wurde oder eine eindeutige phänotypische Zuordnung nicht möglich war.

Aufgrund der hohen Sequenzhomologie von 94% existieren nicht für alle Exone B-Kanal-spezifische Primer. Lediglich bei den Exonen 1, 2, 4, 9, 14, 16, 17 und 18 konnten Primer gefunden und verwendet werden, die ausschließlich am entsprechenden Exon des B-Kanals binden. Bei der Untersuchung der anderen Exone musste der eigentlichen PCR eine Vor-PCR mit dem Ziel vorangestellt werden, ein B-Kanal-spezifisches Fragment, bestehend aus mehreren Exonen, zu schaffen. Dazu wurde mit Primerpaaren gearbeitet, die an benachbarten spezifischen Exonen binden und das zu untersuchende Exon somit flankieren. So bindet der Vorwärts-Primer am letzten vorangegangenen spezifischen Exon in 5`-Richtung, der Rückwärts-Primer am nächst folgenden spezifischen Fragment in 3`-Richtung. Das durch die sich anschließende PCR erlangte Fragment ist spezifisch für den B-Kanal. Zur Untersuchung des Exons 3 wurden der Forward-Primer (F) des Exons 2 und der Reverse-Primer (R) des Exons 4 verwendet. Zur spezifischen Darstellung der Exone 5, 6, 7 und 8 diente im Rahmen der Vor-PCR das Primerpaar 4F und 9R. Um die Exone 10, 11, 12 und 13 zu untersuchen, wurde das Primerpaar 9F und 14R verwendet. In einer zweiten PCR (Haupt-PCR) wurden die für das zu untersuchende Exon vorhandenen Primer verwandt, sodass am Ende auch dieses Exon spezifisch vorhanden war. Eine schematische Darstellung zeigt Abbildung 3.21.

Bei allen Patienten wurde die SSCP-Analyse bei 9°C und 15°C durchgeführt. Wie schon bei der Untersuchung des ROMK wurden alle Patienten mit einem auffälligen Bandenmuster sequenziert. Die Basensequenzen der verwendeten Primer zeigt Tabelle 3.4. Auch die Modifikation der Sequenz-Primer entspricht der der ROMK-Primer. So tragen auch die ClC-Kb-Primer zusätzlich eine

spezifische Abfolge von 20 Basen, an die der Universal-Fluoreszenz-Primer bindet.

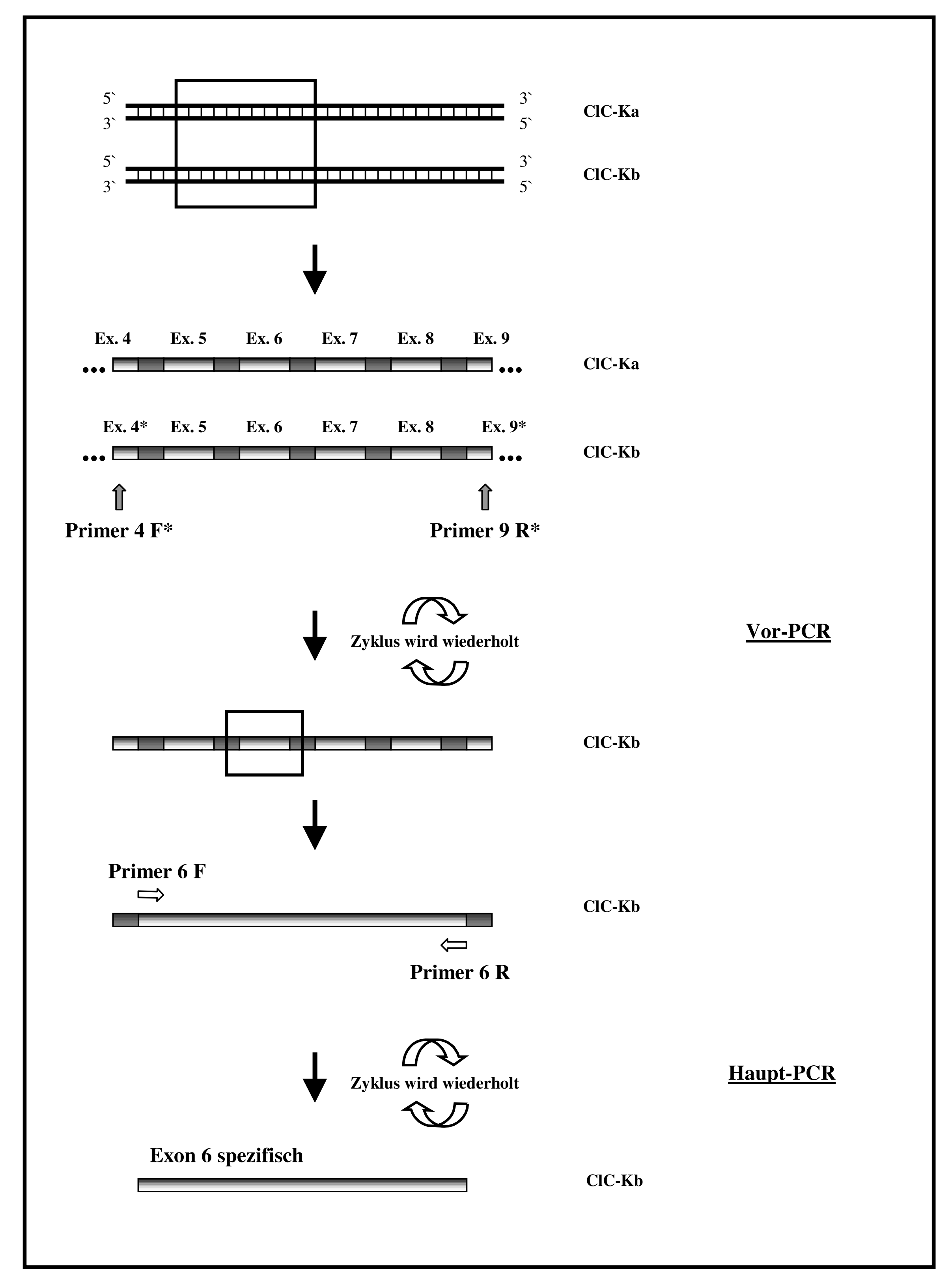



**Abbildung 3.21** Schematische Darstellung der spezifischen Amplifikation am Beispiel des unspezifischen Exons 6; * = B-Kanal-spezifisch

**Tabelle 3.4** Primer-Sequenzen für die SSCP-Analyse im ClC-Kb (5`-3`)

| Primer-Name | Exon | Forward-Primer | Reverse-Primer |
|---|---|---|---|
| ClC-Kb Ex 1 | 1 | ACCGCGGTCCCTCCCTCTAT | GATGTCCTGAGTGGTCCTCCAG |
| ClC-Kb Ex 2 | 2 | TGCCCCACCCTGTGCCGTGAC | CTTGGCCCAGAGCAGCACCTG |
| ClC-Kb Ex 3 | 3 | GAGGCTGTGGGTGCCTCCCTG | AGTGGGGACTGGCGTAGCGAC |
| ClC-Kb Ex 4 | 4 | CCCTCCTGGCCCTGCCCAC | GGGTGGTTGGGATGCCCTCAC |
| ClC-Kb Ex 5 | 5 | Ø funktionierender Primer vorhanden | Ø funktionierender Primer vorhanden |
| ClC-Kb Ex 6 | 6 | GGCTGACTCTGAGCCCTGGAC | GGAGGAGCTTGAGGGACCCAG |
| ClC-Kb Ex 7 | 7 | CCTGAGATCAG | GCAGGGCCAGGGTCAGGCAG |
| ClC-Kb Ex 8 | 8 | GGCCATCTTGGCTCCCCACTG | CTCTTCAGGGGCCCAAGGCAC |
| ClC-Kb Ex 9 | 9 | GTCAGGCTCTGGGCTCATGTC | AGCTCGCTGAGAGGTCCCCAG |
| ClC-Kb Ex 10 | 10 | CAGCCCTAGAGCCCACCCATC | GGGCTTCCCCACTCCTGCCAC |
| ClC-Kb Ex 11 | 11 | CCTCATGTCCAGTTCCCACCTG | GTCCCAGCTCTGTGCACACCTG |
| ClC-Kb Ex 12 | 12 | TGTCCAACGCCTTGCCCAGCAG | CTTTCAGATACCTCCGGACCCCAG |
| ClC-Kb Ex 13 | 13 | CCTCAGGGATGGAGGGCTGTG | CACGACATTGCCCACGCAGCAG |
| ClC-Kb Ex 14 | 14 | CTGCCTGACTCTGCCCTTGCAG | GACTCAGCCTGAGGTGGGCAC |
| ClC-Kb Ex 15 | 15 | GACTGTGGGGCCTGATGGGAG | CCTACCCCCGACTTCCTCCTC |
| ClC-Kb Ex 16 | 16 | GAACAGTTCTTGGCTAAGTAGGTG | CCCATCCCCATGCCCCTCAG |
| ClC-Kb Ex 17 | 17 | GGAGGCCAGCCCTGCACCTG | CCAGAGGCCTCATGTGTCACAC |
| ClC-Kb Ex 18 | 18 | GGGCACCTTCTACCCTCCAGTG | GTCTTCTCAGGCATAGGTTCCCTG |
| ClC-Kb Ex 19 | 19 | TAAATTCCCCCCGCACCTCCAC | AGGGTCTCAGCCCAACCTC |

### 3.1.2.2 Ergebnisse der Mutationssuche

Bei der Untersuchung der Patienten konnten insgesamt 9 relevante, bisher noch nicht bekannte Mutationen gezeigt werden, von denen 8 heterozygot und eine homozygot waren. Dabei handelte es sich zum einen um Punktmutationen, zum anderen um Deletionen, die zu einer Verschiebung des Leserasters führten. Bei einer der Mutationen konnte eine Kombination aus Deletion, Insertion und Punktmutation nachgewiesen werden. Ferner konnten auch einige Silent-Mutations und Polymorphismen aufgezeigt werden (Abbildung 3.22).

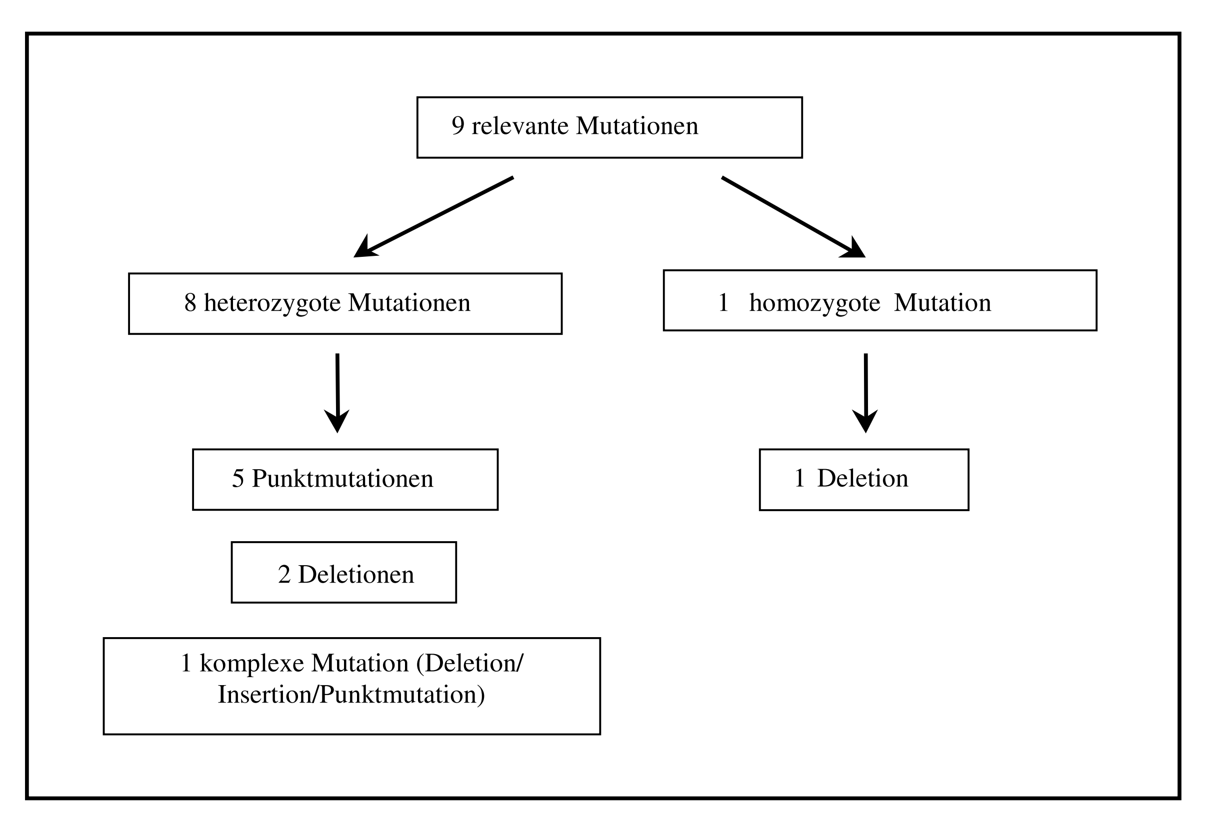



**Abbildung 3.22** Gliederung der relevanten Mutationen im ClC-Kb

Eine Übersicht über die klinischen Daten der Patienten und die Ergebnisse der Mutationsanalyse geben die Tabellen 3.5 und 3.6:

**Tabelle 3.5** Klinische Daten der Patienten mit identifizierter ClC-Kb-Mutation

| | Phänotyp | Polyhydramnion | Gestationsalter (SSW) | Alkalose | Hypokaliämie | Hyperkalziurie | Nephrokalzinose |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Paris P 119 | cBS | - | ø bekannt | + | - | - | - |
| Marb. 7468 | cBS | - | 37 | + | + | - | - |
| Marb. 7438 | HPS | + | 26 | + | + | + | + |
| Marb. 7089 | cBS | - | 38 | + | - | - | - |
| Marb. 7491 | cBS | - | 34 | + | + | - | - |
| Paris P 106 | cBS/GS | - | ø bekannt | + | + | - | - |

Ohne Indometacin-Therapie: Alkalose bei einem Serum-Bikarbonat > 26 mmol/l; Hypokaliämie bei einem Serum-Kalium < 3,3 mmol/l; Hyperkalziurie bei einer Nierenausscheidung > 0,5 mmol/mmol Kreatinin; Nephrokalzinose bei sonographischem Nachweis

**Tabelle 3.6** Übersicht über gefundene ClC-Kb-Mutationen (Die in Zahlen angegebene Lokalisation der Mutation ist durch die Position des Methionins in der cDNA an Position 1/AS 1-3 definiert.)

| | # | Exon | Mutation | Nukleotid | Konsequenz | Homo-zygotie |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Paris P 119 | 1 | 1 | R33Stop (opal) | C97T | trunkiertes Protein | - |
| Paris P 119 | 2 | 16 | E606Stop (amber) | G1816T | trunkiertes Protein | - |
| Marb. 7468 | 3 | 3 | Ins TCAGGCT-TC + Del CAG-AGCATCACA + P116T | Ins TCAGGCTTC + Del CAGAGC-ATCACA + C346A | trunkiertes Protein | - |
| Marb. 7468 | 4 | 14 | Y531Stop (ochre) | C1593A | trunkiertes Protein | - |
| Marb. 7438 | 5 | 17 | C626Y | G1877A | Aminosäuren-austausch | - |
| Marb. 7089 | 6 | 1-19 | kompl. Deletion | kompl. Deletion | kein Protein | + |
| Marb. 7491 | 7 | 1-19 | kompl. Deletion | kompl. Deletion | kein Protein | - |
| Marb. 7491 | 8 | 8 | 849DelCTTTT | 849DelCTTTT | Frame shift | - |
| Paris P 106 | 9 | Intron 4; splice-acceptor | 498+1 G ⇨ C | 498+1 G ⇨ C | Splice-site | - |

Wie bereits im ROMK wurden auch im ClC-Kb, soweit die DNA der Eltern vorhanden war, Familienanalysen durchgeführt, um die Herkunft der Mutation zu sichern und eine Spontanmutation auszuschließen. Im Folgenden werden die Ergebnisse beschrieben und die Befunde der SSCP-Analyse und der Sequenzierung dargestellt:

**Paris P 119:**

Die betroffene Patientin, die phänotypisch dem klassischen Bartter-Syndrom (cBS) zuzuordnen ist, ist Trägerin zweier heterozygoter Punktmutationen. Die Mutation R33Stop (opal) liegt im Exon 1 und wurde von der Mutter an ihre Tochter vererbt. Der Vater gab die sich im Exon 16 befindende Mutation E606Stop (amber) an seine Tochter weiter (Abbildungen 3.23 und 3.24).

**Marb. 7468:**
Bei diesem Patienten konnten zwei Mutationen in den Exonen 3 und 14 gezeigt werden. Bei der Mutation im Exon 3 handelt es sich um eine komplexe heterozygote Mutation, bestehend aus einer Deletion von 15 Basenpaaren, einer Insertion von 12 Basenpaaren und einer Punktmutation P116T (Abbildung 3.25). Somit entsteht aufgrund der unterschiedlichen Länge der Insertion und Deletion ein um eine Aminosäure verkürztes Protein. Da die Mutter nicht Trägerin dieser Mutation ist, ist sie entweder vom Vater, von dem keine DNA vorliegt, übertragen worden oder es handelt sich um eine Spontanmutation.
Die Mutation im Exon 14 ist eine heterozygote Punktmutation. Die Mutation Y531Stop (ochre) wurde von der Mutter an ihren Sohn weitergegeben. Die Mutter selbst ist klinisch gesund, ihr Sohn zeigt die Merkmale des cBS (Abbildung 3.26).

**Marb. 7438:**
Dieser Patient mit der Klinik eines HPS ist Träger der heterozygoten Punktmutation C626Y im Exon 17 (Abbildung 3.27). Diese ist von der Mutter vererbt worden, die selbst klinisch unauffällig ist. Die zweite Mutation konnte nicht gefunden werden.

**Marb. 7089:**
Diese Patientin ist Trägerin einer homozygoten Deletion aller 19 Exone. Elterliche DNA liegt in diesem Fall leider nicht vor, so dass nicht mit Sicherheit festgestellt werden kann, ob diese Deletion von den Eltern jeweils heterozygot vererbt worden ist oder ob es sich um eine Spontanmutation handelt (Abbildung 3.28). Phänotypisch ist sie dem cBS zuzuordnen.

**Marb. 7491:**
Bei dieser Patientin wurden zwei Mutationen gefunden. Sie ist Trägerin einer von der Mutter vererbten heterozygoten Deletion aller 19 Exone und erscheint somit hemizygot (Abbildung 3.29). Bei der zweiten Mutation (Abbildung 3.30) handelt es sich um eine heterozygote Deletion im Exon 8 (DelCTTTT), die man im vorliegenden Fall als kompound heterozygot bezeichnet. Die mütterliche DNA zeigt diese Mutation nicht. Sie wurde daher wahrscheinlich von ihrem

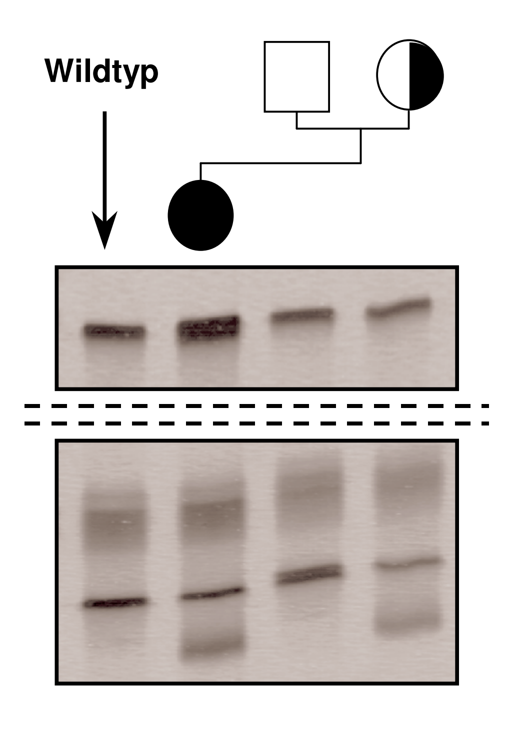
Vater (DNA nicht vorhanden) weitergegeben oder es handelt um eine Spontanmutation. Phänotypisch zeigt sich ein cBS.

**Paris P 106:**

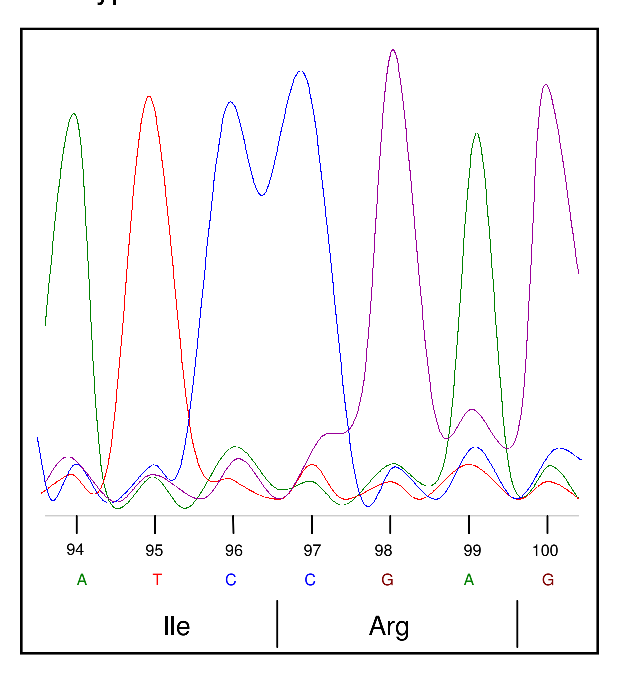
Bei dieser Patientin wurde eine Mutation im Intron 4 unmittelbar hinter dem Ende des Exons 4 (498 + 1). Diese so genannte Splice-site-Mutation wurde vom Vater an die Tochter weitergegeben und liegt bei dieser heterozygot vor (Abbildung 3.31). Die zweite Mutation konnte nicht gefunden werden.

# Mutation # 1

**Paris P 119 ClC-Kb Ex. 1**




Wildtyp




Paris P119

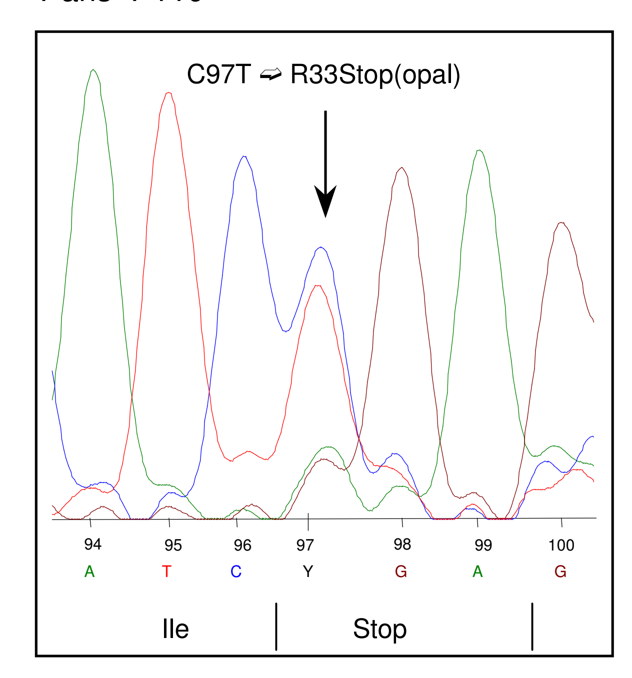
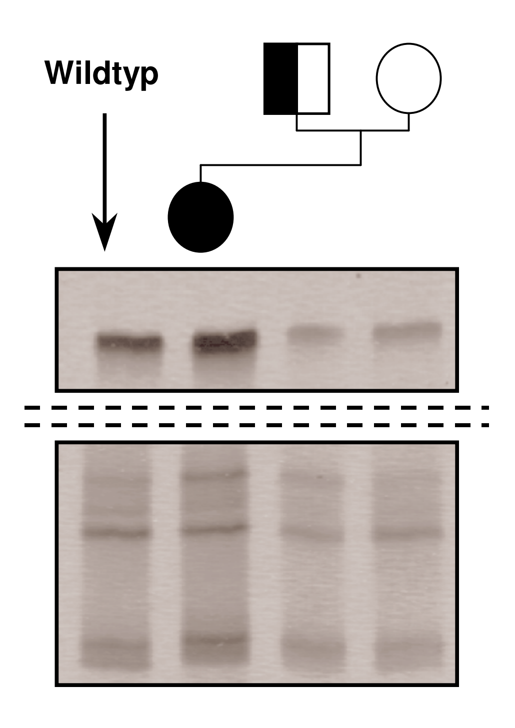


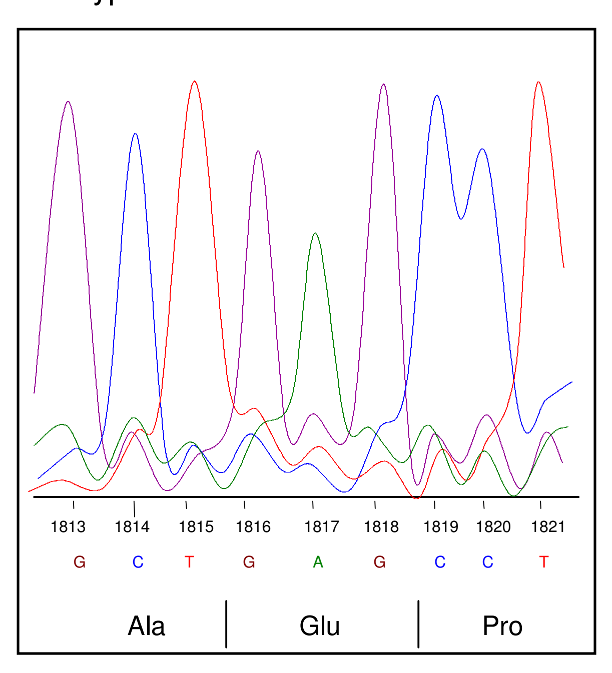

**Abbildung 3.23** Durch den Basenaustausch an Position 97 entsteht anstelle des Arginins (siehe Wildtyp) ein Stopcodon (opal). Das Resultat ist die Entstehung eines trunkierten Proteins.

# Mutation # 2

**Paris P 119 ClC-Kb Ex. 16**




Wildtyp




Paris P119

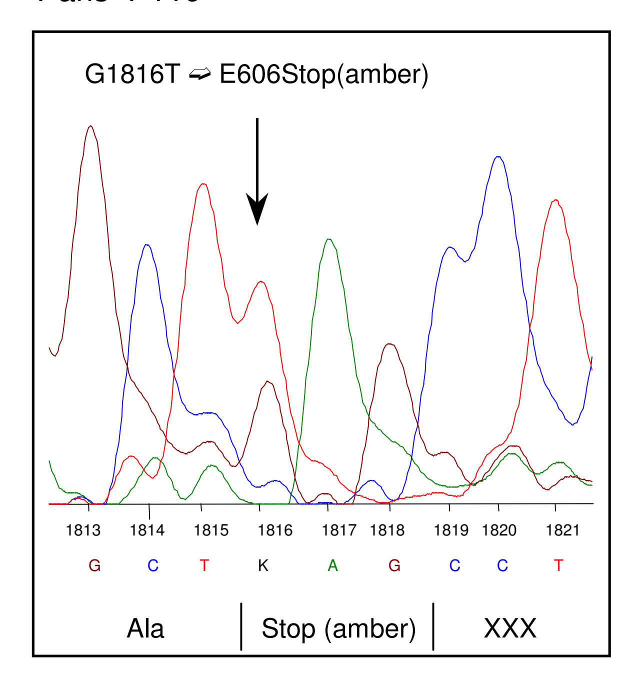
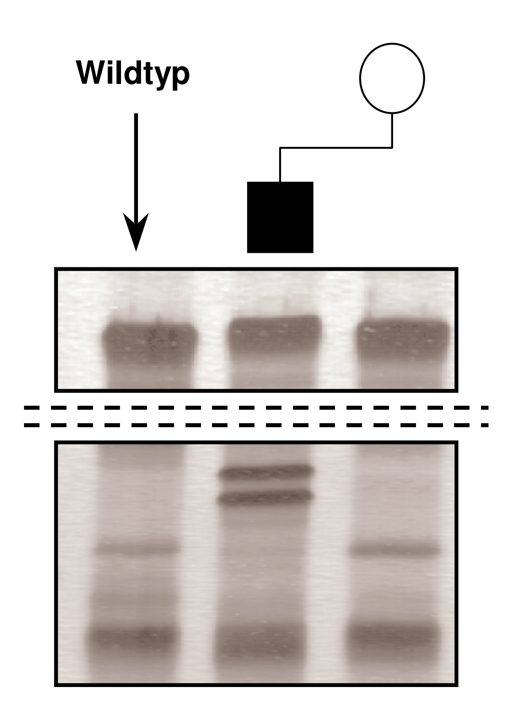


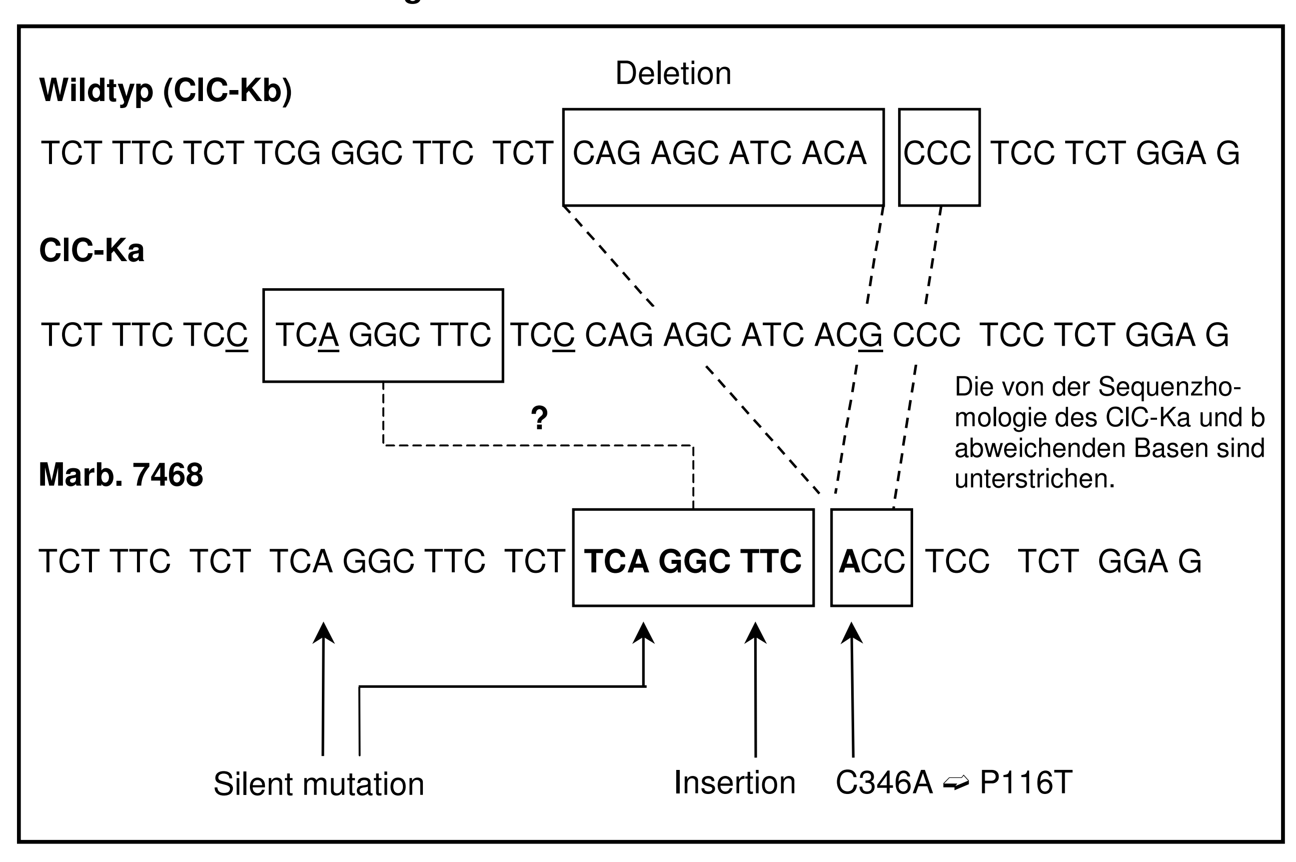

**Abbildung 3.24** Durch den Basenaustausch an Position 1816 entsteht anstelle der Glutaminsäure (siehe Wildtyp) ein Stopcodon (amber). Das Resultat ist die Entstehung eines trunkierten Proteins.

# Mutation # 3



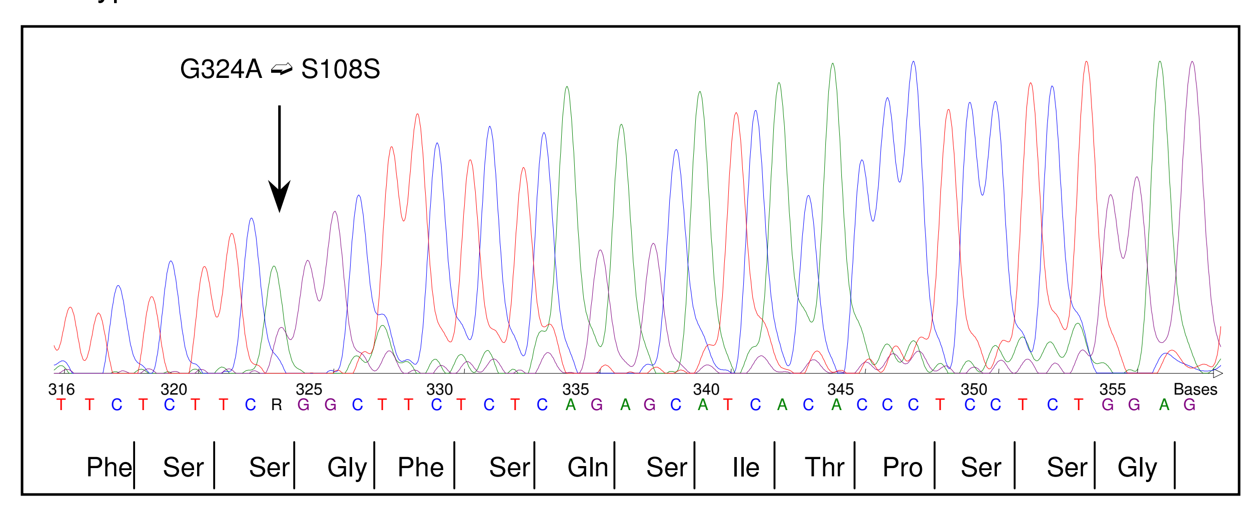




## Schematische Darstellung der Mutation



# Mutation # 3

Wildtyp




Mutation

Ins(TCT)TCAGGCTTC + Del(TCT)CAGAGCATCACA + C346A

Marb. 7468

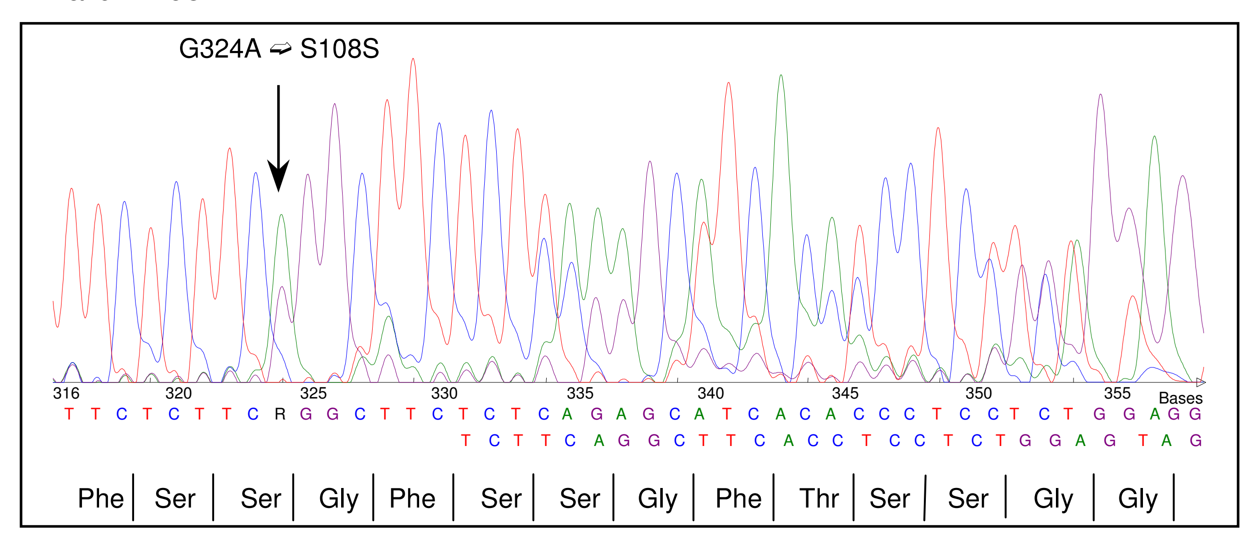
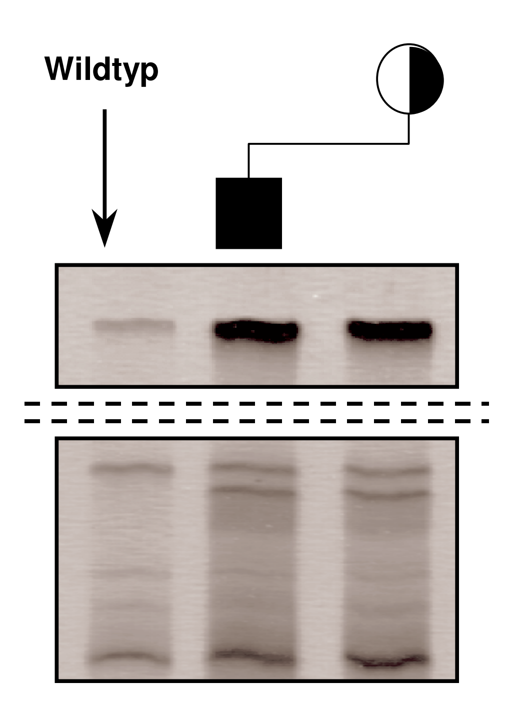


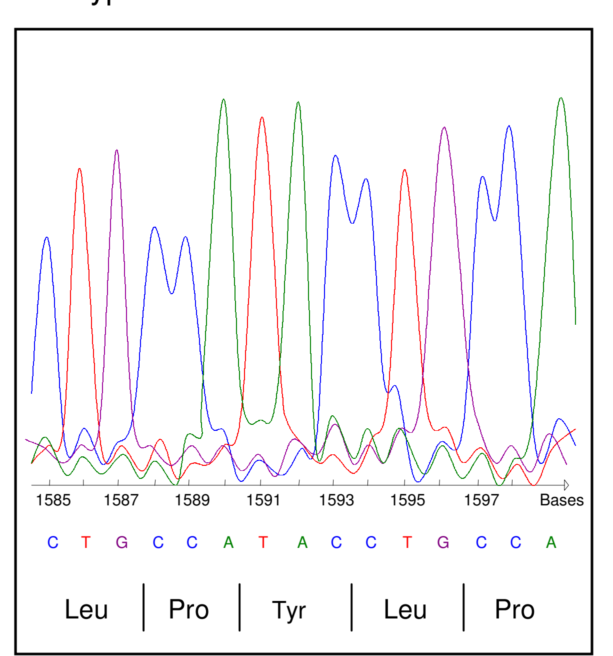

**Abbildung 3.25** Die Kombination der Insertion (12 BP) und der Deletion (15 BP) führt zu einer Verkürzung des Proteins um eine Aminosäure. Zusätzlich zeigt sich an Position 346 eine Punktmutation. Dabei entsteht in dem Protein anstelle eines Prolins (siehe Wildtyp) ein Threonin. Ferner findet sich an Position 324 eine Silent Mutation.

# Mutation # 4

**Marb. 7468 ClC-Kb Ex. 14**




Wildtyp




Marb. 7468

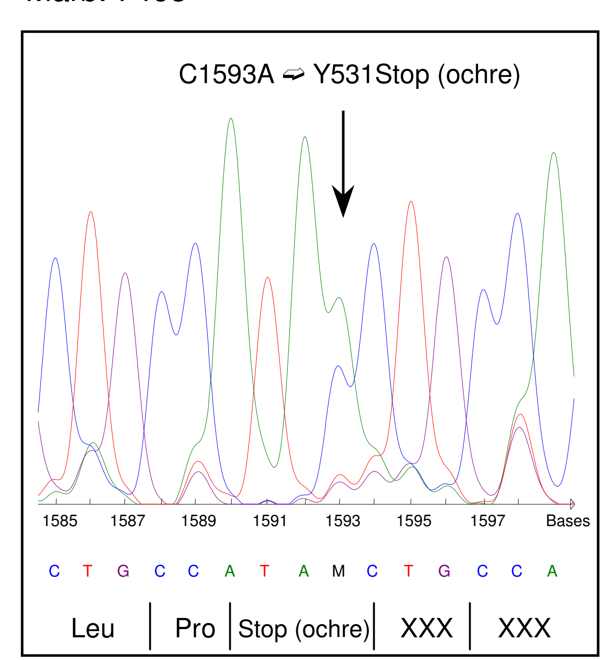
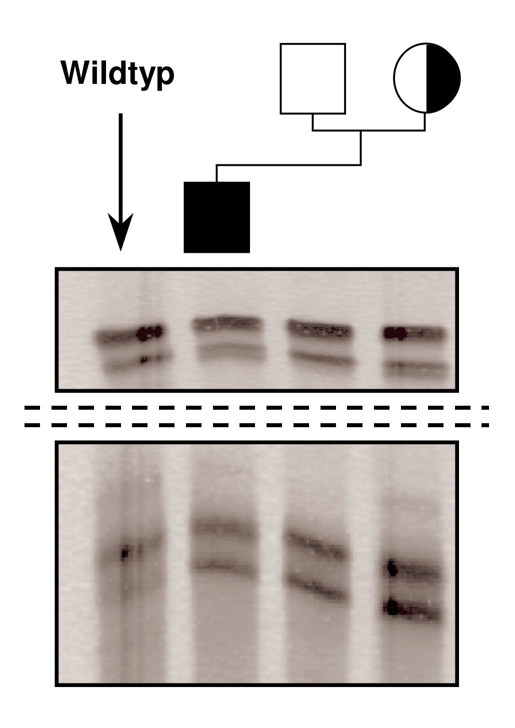


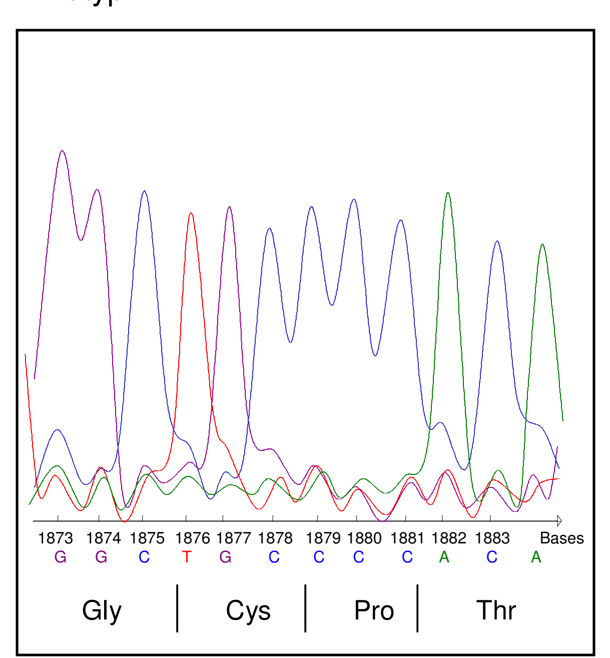

**Abbildung 3.26** Durch den Basenaustausch an Position 1593 entsteht anstelle des Tyrosins (siehe Wildtyp) ein Stopcodon (ochre). Das Resultat ist die Entstehung eines trunkierten Proteins.

# Mutation # 5

**Marb. 7438 ClC-Kb Ex. 17**




Wildtyp




Marb. 7438

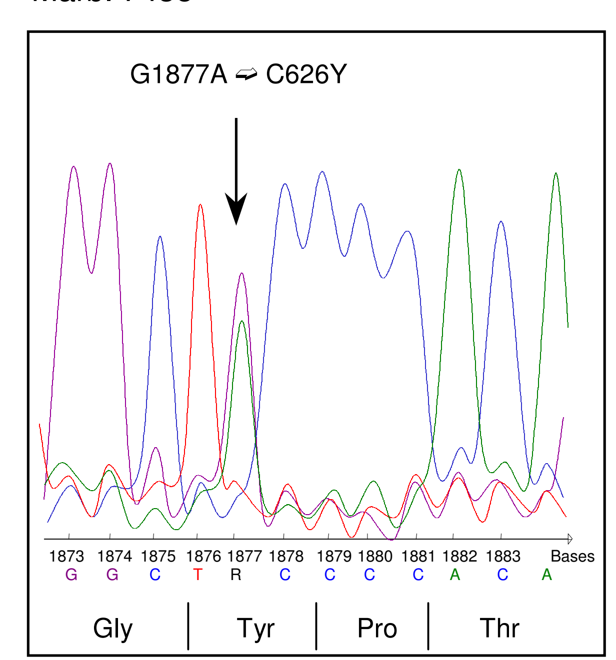
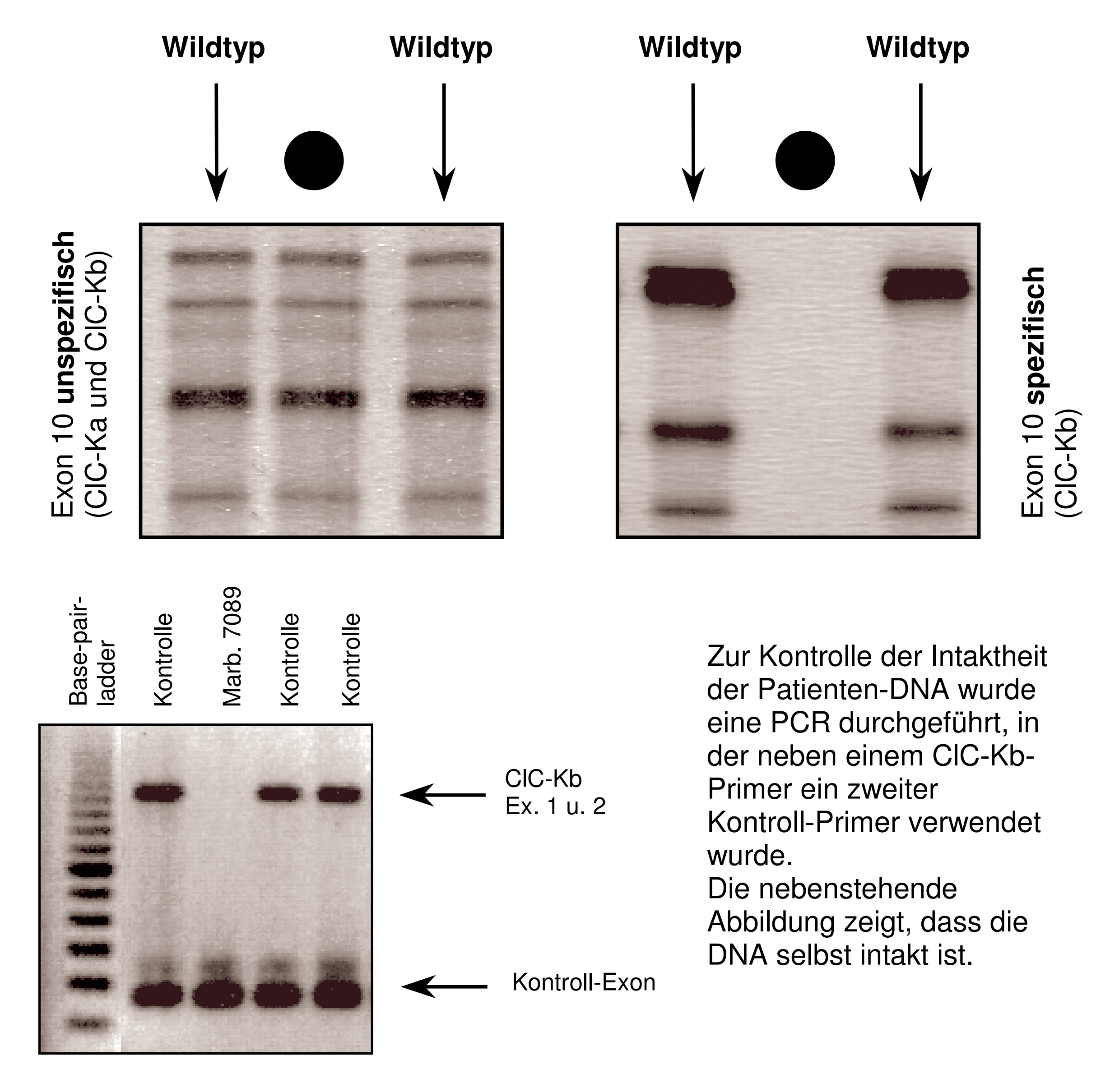



**Abbildung 3.27** Durch den Basenaustausch an Position 1877 entsteht anstelle des Cysteins (siehe Wildtyp) ein Tyrosin.

# Mutation # 6

**Marb.7089 ClC-Kb Ex. 1-19**

Im SSCP fiel bei dieser Patientin auf, dass bei der unspezifischen Darstellung (ClC-Ka und ClC-Kb) Banden zu finden waren, die bei der spezifischen Darstellung (nur ClC-Kb) fehlten. Die Abbildungen zeigen diese am Beispiel des Exon 10.



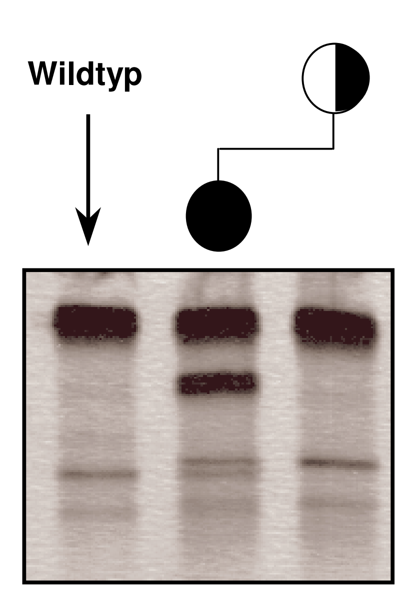

Zur Kontrolle der Intaktheit der Patienten-DNA wurde eine PCR durchgeführt, in der neben einem ClC-Kb-Primer ein zweiter Kontroll-Primer verwendet wurde.
Die nebenstehende Abbildung zeigt, dass die DNA selbst intakt ist.

**Abbildung 3.28** Es liegt eine komplette homozygote Deletion des ClC-Kb vor. Daher wird kein Kanalprotein exprimiert.

# Mutation # 7

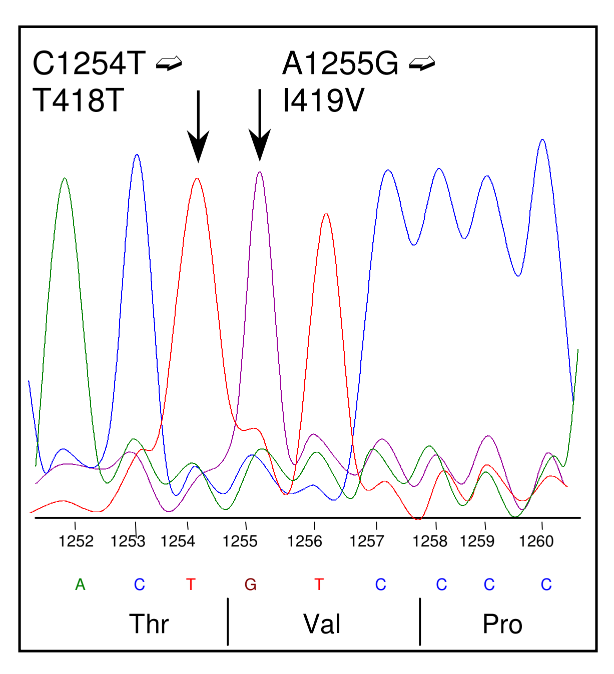
**Marb.7491 ClC-Kb Ex. 1-19**

Neben der Mutation in Exon 8 (Abb. 3.30) erscheinen auch in anderen Exonen sämtliche Polymorphismen hemizygot. In der nebenstehenden Abbildung ist als Beispiel das Exon 12 spezifisch dargestellt. Es zeigt sich ein deutlicher Banden-shift bei der Patientin, nicht hingegen bei der Mutter.




Die unten gezeigten Sequenzierungen des Exons 12 zeigen bei der Patientin zwei hemizygote Mutationen (Polymorphismen), die sich bei der Mutter nicht finden. Man kann daher davon ausgehen, dass die heterozygote Deletion aller Exone von der Mutter an ihre Tochter weitergegeben wurde.

Marb. 7491




Mutter von Marb. 7491

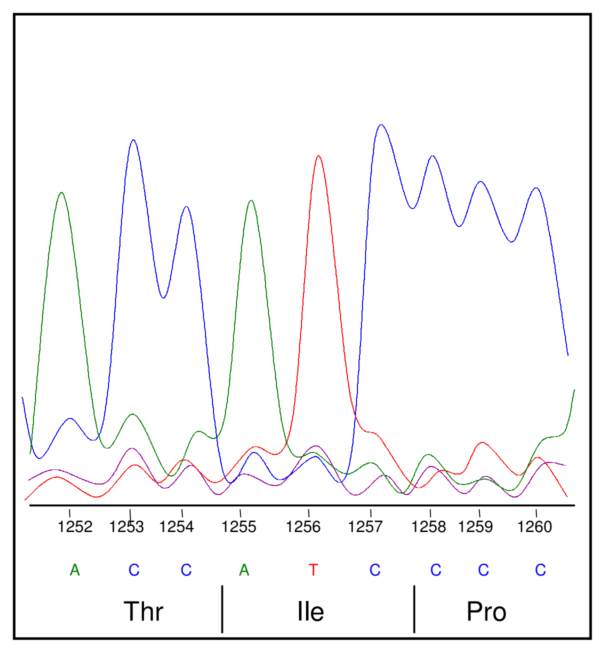


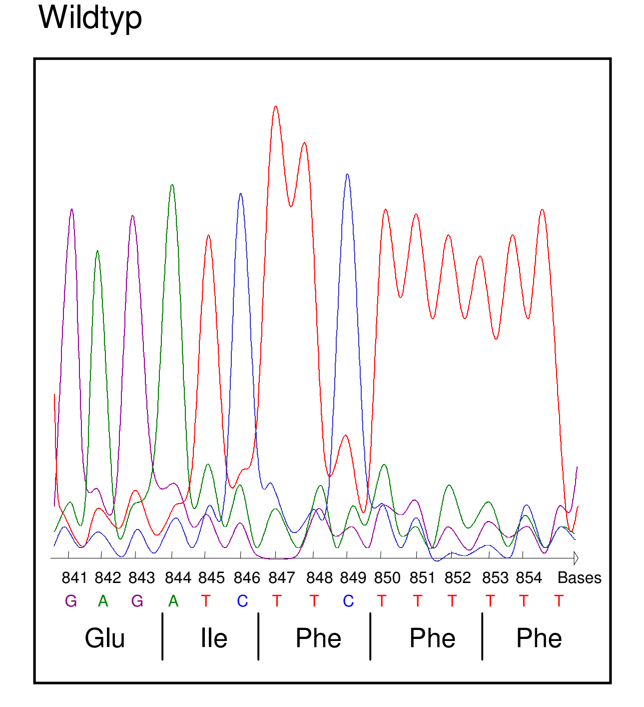

**Abbildung 3.29** Durch die heterozygote Deletion aller Exone des ClC-Kb erscheint die Sequenz hemizygot (siehe dazu auch Abbildung 3.30).

# Mutation # 8

**Marb. 7491 ClC-Kb Ex. 8**

Wildtyp

**Anmerkung:**
Durch die heterozygote Deletion des gesamten ClC-Kb bei dieser Patientin (siehe Mutation # 7) erscheint die heterozygote Deletion CTTTT in der Sequenzierung kompound heterozygot.



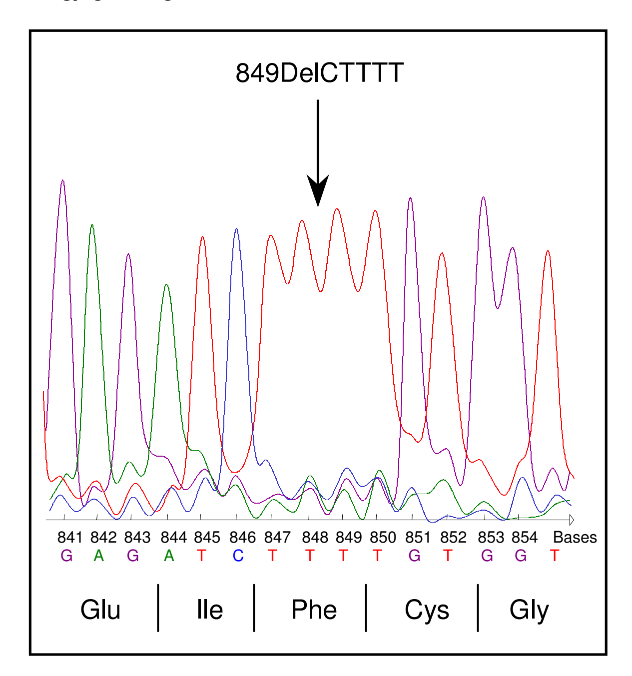
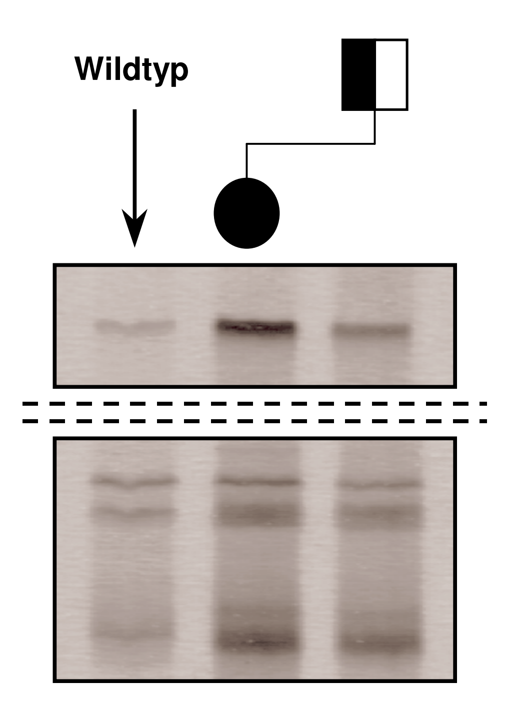



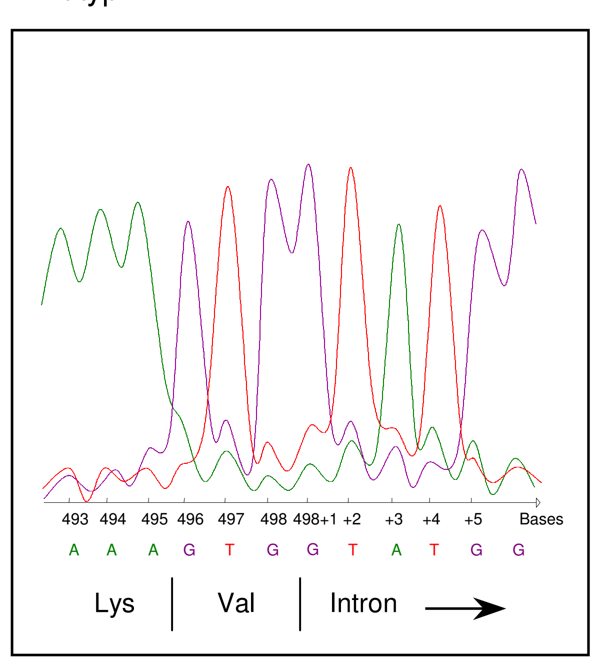

**Abbildung 3.30** Durch die hemizygote Deletion an Position 849 kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters. Die Folge ist die Entstehung eines Stop-Codon an Position 934 und damit die Bildung eines trunkierten Proteins.

# Mutation # 9

**Paris P 106 ClC-Kb Intron 4**




Wildtyp




Paris P 106

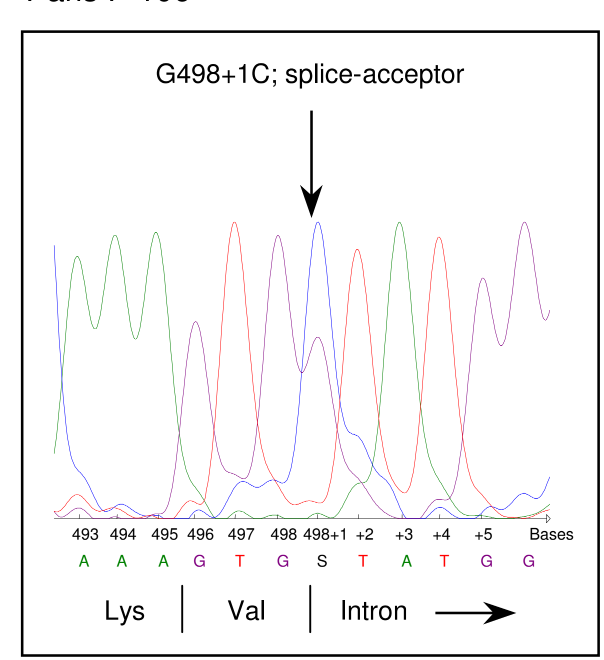



**Abbildung 3.31** Durch die heterozygote Basensubstitution an Position 498+1 (Intron 4) kommt es zu einer Strukturänderung der Ligasen-Bindungsstelle.

# 4 Diskussion

Im folgenden Kapitel werden die in Kapitel 3 beschriebenen Mutationen unter verschiedenen Gesichtspunkten diskutiert. Dabei steht die pathogenetische Bedeutung der einzelnen Mutationen im Vordergrund. Welche Auswirkung hat jede einzelne Mutation auf die Kanalfunktion? Kommt es dabei zu einer Funktionseinschränkung oder zu einem kompletten Verlust der Kanalfunktion? Bei einem Teil Patienten liegen Daten elektrophysiologischer Messungen nach Expression der Mutation in Oocyten vor. Die Auswirkungen der Mutation bei diesen Patienten kann somit eindrücklich belegt werden.
Ferner wird der Frage nach der Korrelation von Genotyp und Phänotyp an dieser Stelle ebenfalls nachgegangen, sofern dies aufgrund der vorliegenden klinischen Daten der Patienten möglich ist. Lässt sich ein Zusammenhang zwischen der Art der Mutation und der damit verbundenen Veränderung der Kanalfunktion und dem Ausprägungsgrad des Phänotyps aufzeigen?
Gegenstand dieser Arbeit ist die molekulargenetische Untersuchung von 71 Kindern mit Hyperprostaglandin-E-Syndrom (HPS) oder klassischem Bartter-Syndrom (cBS). Darüber hinaus wurden einige Patienten untersucht, die sich nicht eindeutig dem Phänotyp des HPS oder cBS zuordnen ließen.

## 4.1 Das ROMK-Gen (KCNJ1)

Bei dem untersuchten Kaliumkanal ROMK handelt es sich um einen luminalen ATP-abhängigen Kaliumkanal im Tubulus-Apparat der Niere [BOIM et al. 1995], [McNICHOLAS et al. 1996a], der im Bereich der Henleschen Schleife eine lumeneinwärts gerichtete Transportfunktion besitzt. Neben der ATP-vermittelten Modulation der Kanalfunktion [WANG et al. 1992], [McNICHOLAS et al. 1994] zeigt dieser Kanal entgegen lange bestehender Meinung auch eine pH-Abhängigkeit [TSAI et al. 1995], [SCHULTE et al. 1999]. So ist in der Henleschen Schleife die Kaliumsekretion ins Tubuluslumen von entscheidender Bedeutung für den transepithelialen Natrium-Chlorid-Transport. Daher führt eine

Funktionsstörung des ROMK in diesem Tubulusabschnitt zu einer Hemmung der Natrium-Chlorid-Rückresorption [HEBERT et al. 1984], [GIEBISCH u. WANG 1996].
Bislang unklar ist die Spezifität, mit der die 5 Isoformen des ROMK (ROMK1 – ROMK5) entlang des Nephrons exprimiert werden [YANO et al. 1994]. Untersuchungen an Ratten zeigen eine Expression im Bereich der Makula densa und dem dicken aufsteigenden Teil der Henleschen Schleife bis hin zum kortikalen Sammelrohr [LEE u. HEBERT 1995], [BOIM et al. 1995].
Der Kanal besteht aus den zwei Transmembrandomänen M1 und M2, welche durch das extrazellulär gelegene H5-Segment verbunden sind (siehe auch Abbildung 4.1). Dieses Segment enthält die für die Porenstruktur entscheidenden Aminosäuren und hat somit große Bedeutung für die Kaliumselektivität. Unmittelbar vor der M1-Domäne liegt in Richtung des N-Terminus das M0-Segment, welches bei der pH-Regulation eine entscheidende Rolle spielt. In C-terminaler Richtung schließt sich unmittelbar an die Domäne M2 die ATP-Bindungsregion an, welche die Phosphat-Bindungsstelle, die so genannte Walker-A-site, enthält.

### 4.1.1 Mutationen im *KCNJ1*

Im Folgenden werden 19 Mutationen, die im Rahmen dieser Arbeit identifiziert werden konnten, diskutiert. Dabei handelt es sich um 14 heterozygote und 5 homozygote Mutationen, die als Punktmutationen, Deletionen bzw. als Insertion vorliegen. In dem aus 50 Personen bestehenden Kontrollkollektiv konnte keine dieser Mutationen nachgewiesen werden. Bis auf zwei Mutationen, die als homozygote Deletion des Exons 1 und 2 erscheinen, sind alle anderen im Bereich des Exons 5 lokalisiert. Neben jeweils zwei Mutationen im H5-Segment und der ATP-Bindungsregion liegen zehn Mutationen zwischen dieser und dem C-Terminus, drei weitere zwischen dem N-Terminus und dem M0-Segment.
Eine graphische Übersicht über die Lokalisation der Mutationen gibt die Abbildung 4.1.

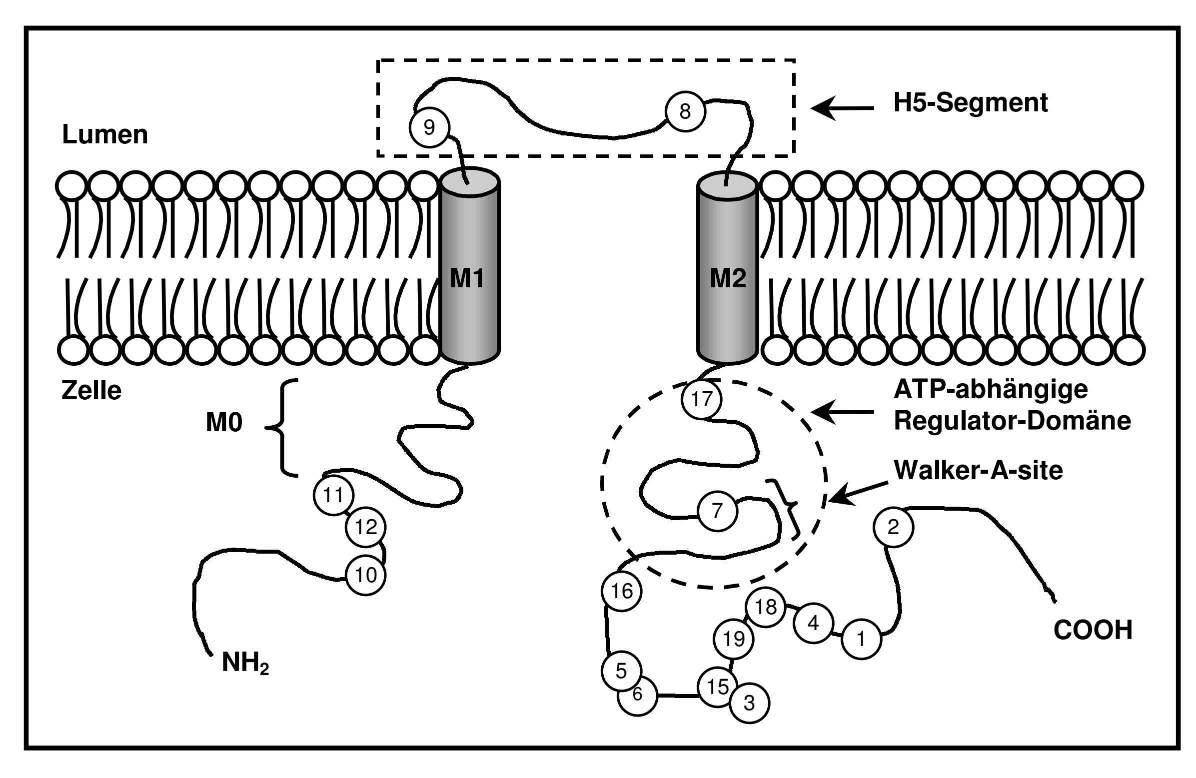



**Abbildung 4.1** Strukturmodell des ROMK1. Die Zahlen in den Kreisen zeigen die Lokalisation der Mutationen innerhalb des Kaliumkanals und entsprechen der Nummer der Mutation laut Tabelle 3.3. Da es sich bei den Mutationen #13 und #14 um Deletionen der Exone 1-2 handelt, sind diese nicht dargestellt.

Bei der Mutation #1 handelt es sich um eine homozygote Deletion von 4 Basenpaaren (1053DelAAAG) im Exon 5. Es resultiert eine Verschiebung des Leserasters mit der Folge der Entstehung eines Stop-Kodons an der Aminosäure-Position 368 (R368Stop(opal)). Das entstandene Kanalprotein ist somit in seiner Aminosäuresequenz in Richtung des C-Terminus auf einer Länge von 36 Aminosäuren verändert und aufgrund des vorzeitigen Kettenabbruchs um 21 Aminosäuren kürzer. Eine Veränderung der Kanalfunktion aufgrund der Strukturveränderung des Proteins im Bereich des C-Terminus ist anzunehmen, zumal gezeigt werden konnte, dass die Intaktheit des C-terminalen Endes für die regelrechte Kanalfunktion von großer Bedeutung ist [TAGLIALATELA et al. 1994]. Mutationen im Bereich des C- und N-Terminus führen zu einer Veränderung der strukturellen Anordnung der so genannten Arg-Lys-Arg-Triade (Arg-41, Lys-80, Arg-311). Diese ist maßgeblich an der pH-Regulation des Kanals beteiligt [SCHULTE et al. 1999], sodass Mutationen in diesem Bereich zu einer deutlichen Veränderung der Kanalfunktion führen können. Die genauen Auswirkungen einer Änderung des pH-Wertes sind im Rahmen der Diskussion der Mutation #5 erläutert.

Klinisch zeigt die Patientin das phänotypische Bild eines HPS mit einem Polyhydramnion, eine Frühgeburtlichkeit in der 36. SSW, eine im 1. Lebensmonat aufgetretene Nephrokalzinose und eine metabolische Alkalose. Eine Hypokaliämie findet sich nicht (minimaler Kalium-Wert 3,8 mmol/l), wohl aber eine Hyperkalziurie.

Bei dem Patienten Marb. 7023 konnten zwei heterozygote Mutationen gezeigt werden (Mutation #2 und #3), die ebenfalls im Exon 5 liegen. Durch die Insertion eines Cytosins an Position 1116 (Mutation #2) bleibt das an dieser Stelle befindliche Prolin zwar erhalten, im Folgenden kommt es allerdings zu einer Verschiebung des Leserasters mit der Konsequenz eines Stop-Kodons an Position 362 (P362Stop(ochre)). Daraus folgt, dass das Kanalprotein auf einer Länge von 9 Aminosäuren verändert und aufgrund des vorzeitigen Kettenabbruchs um 27 Aminosäuren verkürzt ist.
Bei der zweiten Mutation (#3) handelt sich um die Punktmutation V315G. Beide Mutationen liegen im Bereich des C-Terminus. Wie bereits oben erläutert, ist eine Störung der Kanalfunktion durch Veränderungen im Bereich der Arg-Lys-Arg-Triade wahrscheinlich.
Klinisch zeigt der Patient das Bild eines HPS mit einem Polyhydramnion, einer Frühgeburtlichkeit in der 30. SSW, einer Nephrokalzinose, eine Hyperkalziurie und eine deutliche Hypokaliämie mit einem Minimalwert von 2,2 mmol/l.

Bei den Mutationen #4 und #5 handelt es sich jeweils um heterozygote Punktmutationen (Patient Marb. 7399).
Bei der Mutation #4 wird an Position 325 ein Cystein gegen ein Phenylalanin ausgetauscht. Wie bereits bei den oben beschriebenen Mutationen erläutert, ist eine Störung der pH-Regulation durch diese Mutation möglich.
Die zweite Mutation dieses Patienten (#5) zeigt den Austausch eines Arginins gegen ein Glutamin an Position 311. Das Arginin-311 ist Teil der Arginin-Lysin-Arginin-Triade (Arg-41, Lys-80, Arg-311) und hat daher maßgeblichen Einfluss auf die pH-Regulation [SCHULTE et al. 1999]. Experimentell zeigte sich nach Austausch aller intrazellulär gelegenen Lysine und Arginine durch Glutamin keinerlei Kanalaktivität bis zu einem intrazellulären pH-Wert ($pH_i$) von 10,0, wobei unter Normalbedingungen die halbmaximale pH-abhängige Kanalaktivität

($\Delta pH_{0,5}$) bei einem $pH_i$ von 6,8 liegt. Weitere Untersuchungen ergaben, dass ab einer Verschiebung des $\Delta pH_{0,5}$ um 0,4 Einheiten mit schweren klinischen Symptomen zu rechnen ist. Ein $pH_i$-Abfall führt zum Schluss, ein $pH_i$-Anstieg zur Öffnung des Kanals. Bei Mutationen in diesem Bereich bleibt die Kanalfunktion selbst erhalten, vielmehr kommt es zu einer Verschiebung des Aktivitätsbereichs des pH-Sensors aus dem neutralen Bereich heraus [SCHULTE et al. 1999]. Aufgrund der deutlichen Verschiebung des $\Delta pH_{0,5}$ um 2,1 Einheiten bei der Mutation R311W (siehe Mutation #6) kann sicherlich davon ausgegangen werden, dass es auch bei dieser Mutation zu einer deutlichen Funktionsänderung des Kanals kommt.
Der Patient wurde in der 29. SSW geboren, es bestand ein Polyhydramnion. Postpartal zeigten sich eine Hyperkalziurie mit konsekutiver Nephrokalzinose und eine Hypokaliämie.

Bei der Patientin Marb. 7451 konnten ebenfalls zwei heterozygote Mutationen (#6 und #7) nachgewiesen werden.
Auch die Mutation #6 (R311W) hat ihre Lokalisation im Bereich der Arg-Lys-Arg-Triade, deren Bedeutung oben bereits ausführlich beschrieben wurde. Im Rahmen der Arbeit von Schulte et al. wurde diese Mutation exprimiert und elektrophysiologisch untersucht. Dabei wurde ein $\Delta pH_{0,5}$ von 2,1 gemessen [SCHULTE et al. 1999]. Die Kanalfunktion ist daher sicherlich deutlich eingeschränkt.
Bei der Mutation #7 (L220F) handelt es sich um eine heterozygote Punktmutation. Sie liegt im Bereich der ATP-bindenden Region und nur 3 Aminosäuren von der Walker-A-site entfernt, welche sich an Position 223 befindet. Diese Walker-A-site stellt die Phosphatbindungsstelle dar und spielt somit eine wichtige Rolle bei der Regulation der Kanalfunktion. Durch diese Mutation kommt es zu einer Verschiebung des $\Delta pH_{0,5}$ um 0,4 Einheiten.
Die Mutation liegt zudem nur eine Aminosäure hinter einer Bindungsstelle einer cAMP-abhängigen Proteinkinase A. Mutationen in diesem Bereich führen entweder aufgrund eines beschleunigten Kanalverschlusses oder durch eine Verlängerung der Verschlusszeit selbst zu einer verminderten Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals [JECK et al. 2001b]. Es ist daher von

einer deutlichen Veränderung der Kanalfunktion aufgrund dieser beiden Mutationen auszugehen.
Die vorliegenden klinischen Daten bestätigen dies. Die Geburt fand in der 30 SSW statt, ein Polyhydramnion lag vor. Im Folgenden zeigten sich eine hypokaliämische Alkalose, eine Hyposthenurie und eine Hyperkalziurie mit Nephrokalzinose.

Die Mutationen #8 und #9 sind beides heterozygote Punktmutationen der Patientin Marb. 7466.
Die Mutation #8 (I142T) liegt im Bereich des extrazellulären H5-Segments, wobei es sich um die Poren-formende-Region des Kanals handelt. Der ROMK1 zeigt ein im Alignment konserviertes GYG-Motiv (Gly143/Tyr144/Gly145), welches für die Kalium-Selektivität von entscheidender Bedeutung zu sein scheint [HO et al. 1993], [JECK et al. 2001b]. Die Expression dieser Mutation in Xenopus Oocyten zeigte bei einem Membranpotential vom –100 mV eine gegenüber dem Wildtyp um ca. 99% reduzierte Stromamplitude von –0,5 ± 0,4 µA (Wildtyp: -50,6 ± 8,0 µA).
Die Mutation #9 (P110L) ist ebenfalls extrazellulär im H5-Segment lokalisiert und liegt nur 5 Aminosäuren hinter der M1-Domäne (Transmembrandomäne). Die Expression auch dieser Mutation zeigte ebenfalls eine deutliche Reduzierung der Stromamplitude gegenüber dem Wildtyp um 65% auf –18,5 ± 3,9 µA.
Die im Falle der exprimierten extrazellulär gelegenen Mutationen deutlichen Veränderungen der gemessenen Ströme lassen vermuten, dass die Tertiärstruktur des gesamten extrazellulären H5-Segmentes essentiell für die Kanalfunktion ist, obwohl dieser Bereich nicht direkt an der Bildung der Porenstruktur beteiligt ist [JECK et al. 2001b].
Klinisch zeigt diese Patientin die Symptome eines Hyperprostaglandin-E-Syndroms mit metabolischer Alkalose, Polyhydramnion und einer Frühgeburtlichkeit in der 30.SSW. Zudem trat eine deutliche Hypokaliämie mit einem minimalen Serum-Kalium-Wert von 2,3 mmol/l auf. Ferner finden sich eine Hyperkalziurie mit Nephrokalzinose und eine Isosthenurie.

Bei der Mutation #10 handelt es sich um eine homozygote Punktmutation (K45E).
Die Mutation befindet sich intrazellulär und liegt in direkter Nachbarschaft zu der an Aminosäureposition 44 lokalisierten cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA). Wie bereits bei Mutation #7 besprochen, führen Mutationen im Bereich der Bindungsstellen der PKA zu einer Veränderung der Kanalfunktion.
Ferner befindet sich in der Nähe dieser Mutation das Arg41 als Teil der Arg-Lys-Arg-Triade (oben bereits näher erläutert). Es lässt sich daher vermuten, dass diese Mutation ebenfalls Auswirkungen auf die pH-Regulation des Kanals hat. Die Verschiebung des $\Delta pH_{0,5}$ von mehr als 0,4 Einheiten durch die Mutationen #11 und #12, die sich ebenfalls in diesem Bereich befinden, unterstreicht diese Vermutung.
Der Patient ist als Frühgeborenes der 32. SSW geboren worden. Während der Schwangerschaft bestand ein Polyhydramnion. Ferner fanden sich eine Hypokaliämie, eine metabolische Alkalose, Hyperkalziurie und eine Nephrokalzinose.

Die Mutationen #11 (I51T) und #12 (C49Y) sind beides heterozygote Punktmutationen, die intrazellulär und in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander liegen.
Die räumliche Nähe zum Arg41 lässt eine Änderung der pH-Regulation des Kanals aufgrund dieser Mutationen vermuten. Entsprechende Untersuchungen stützen diese Vermutung. So konnte gezeigt werden, dass es im Falle der Mutation I51T zu einer Änderung des $\Delta pH_{0,5}$ um 0,5 Einheiten kam. Bei der Mutation C49Y betrug diese 0,7 Einheiten [SCHULTE et al. 1999].
Die Patientin ist in der 33. SSW geboren worden. Während der Schwangerschaft bestand ein Polyhydramnion. Klinisch zeigt sie die Symptome eines Hyperprostaglandin-E-Syndroms mit einer schweren Hypokaliämie (minimaler Serum-Wert 2,1 mmol/l), einer metabolischen Alkalose, Hyperkalziurie und Nephrokalzinose.

Bei den Mutationen #13 und #14 handelt es in beiden Fällen um homozygote Deletionen der Exone 1 und 2.

Beide Patienten haben eine Deletion von mindestens 1100 Basenpaaren, welche vermutlich wichtige Transkriptionselemente wie die TATA-Box und die CAAT-Promotor-Box in 5`-Richtung des Exons 1 mit einschließt. Diese Promotorelemente werden zur Ausbildung der Isoformen 2 und 3 des ROMK benötigt, wohingegen die Transkription des ROMK1 durch einen zweiten Promotor in 5`Richtung des Exons 4 initiiert wird. Dieser ist unabhängig von anderen weiter aufwärts gelegenen Promotor-Regionen. Obgleich beide Patienten einen funktionsfähigen ROMK1 exprimieren, entwickelten sie eine schwere Fehlfunktion im Bereich des dicken aufsteigenden Teils der Henleschen Schleife (TAL). Dies kann durch die unterschiedliche Expression der ROMK-Isoformen entlang des Nephrons bedingt sein, wie dies bei Ratten gezeigt werden konnte. Diese exprimierten die Isoformen 2 und 3 im TAL und die Isoform 1 ausschließlich in den kortikalen Sammelrohren [BOIM et al. 1995]. Überträgt man dieses Modell auf den Menschen, müsste man erwarten, dass ROMK1 überwiegend an der Kaliumsekretion im distalen Nephron beteiligt ist. In der Tat haben die meisten der betroffenen Kinder mit Mutationen im Exon 5 (betroffen sind somit alle 5 Isoformen des ROMK) transiente Hyperkaliämien in der Neonatalperiode vermutlich aufgrund defekter kortikaler Sammelrohre. Das Fehlen dieser Hyperkaliämien bei diesen beiden Patienten ist mit der Vorstellung vereinbar, dass die Kalium-Sekretion via ROMK1 in diesen Fällen erhalten ist. Es ist zu erwarten, dass die Patienten mit einem funktionierenden ROMK1 in der Folge weniger deutliche Hypokaliämien entwickeln, als dies bei Patienten der Fall ist, die eine Mutation im Exon 5 haben. Aufgrund der frühzeitigen Diagnose dieser beiden Patienten und der eingeleiteten Therapie mit Indometacin und Kaliumsubstitution kann diese Vermutung allerdings nicht weiter belegt werden [JECK et al. 2001b].

Bei der Mutation #15 handelt es sich um eine homozygote Punktmutation (V315E). Die Patientin zeigt die Symptome eines HPS mit Hypokaliämie, metabolischer Alkalose, Nephrokalzinose und Hyperkalziurie.
Da die Mutation nur vier Aminosäuren von dem Arginin311 als Teil der Arg-Lys-Arg-Triade entfernt liegt, auf dessen wichtige Rolle im Rahmen der pH-Regulation bereits ausführlich eingegangen wurde, ist eine Veränderung der Kanalfunktion sicher zu erwarten.

Bei der Patientin P81 konnten zwei heterozygote Mutationen (#16 und #17) gefunden werden. Dabei handelt es sich zum einen um eine Punktmutation (L297S) und zum anderen um eine Deletion (Del607A).
Die Mutation #16 liegt nur unweit des Arg311 als Teil der Arg-Lys-Arg-Triade entfernt. Es ist möglich, dass eine Veränderung der Proteinstruktur in diesem Bereich einen Einfluss auf diese und damit auf die pH-Regulation des Kanals hat.
Die zweite Mutation der Patientin (Mutation #17) hingegen hat sicher einen deutlichen Einfluss auf die Struktur und die Funktion des Kanals. Die heterozygote Deletion eines Adenosins an der Position 607 führt zu einer Verschiebung des Leserrasters mit dem Resultat der Bildung eines vorzeitigen Stop-Kodons (ochre) an Position 199 des Proteins. Die Folge ist die Entstehung eines um 190 Aminosäuren verkürzten Proteins. Durch die deutliche Veränderung des C-Terminus verändern sich die Kanaleigenschaften z.B. in Bezug auf die pH-Regulation sicher maßgeblich. Da die Mutation zudem im Bereich der ATP-bindenden Region liegt, ist auch hier mit einer Störung der Kanalfunktion zu rechnen.
Klinisch zeigt die Patientin die Symptome einer Hypokaliämie, eine metabolische Alkalose, eine Hyperkalziurie mit Nephrokalzinose.

Bei den Mutationen #18 und #19 handelt es sich um zwei heterozygote Punktmutationen des Patienten N1.
Beide Mutationen (R324L und L320P) liegen im Bereich des C-Terminus und nur 9 bzw. 1 Aminosäuren von dem Arg311 der Arg-Lys-Arg-Triade entfernt. Wie bereits mehrfach im Zusammenhang mit anderen Mutationen in dieser Region diskutiert, ist auch in diesem Fall eine Veränderung der Kanalfunktion aufgrund einer Störung der pH-Regulation zu erwarten.
Klinisch zeigt der Patient eine hypokaliämische Alkalose, eine Hyperkalziurie und eine Nephrokalzinose und damit die Symptome eines HPS.

Eine valide Korrelation von Phäno- und Genotyp ist aus den wenigen vorliegenden klinischen Daten sicherlich nicht möglich. Bei einigen der untersuchten Patienten finden sich sowohl deutliche Veränderungen der

Kanalfunktion aufgrund einer schwerwiegenden Änderung des $\Delta pH_{0,5}$ als auch ausgeprägte klinische Symptome. Ob dies allerdings in einem echten Zusammenhang zueinander steht, bleibt noch zu klären. Interessant ist sicher der bereits bei den Patienten mit den Mutationen #13 und #14 diskutierte klinische Aspekt aufgrund eines intakten ROMK1. Allerdings handelt es sich hierbei lediglich um die Beschreibung bzw. das Fehlen von Symptomen. Die Formulierung einer klaren Regel lassen diese Daten sicherlich nicht zu.

## 4.2 Das ClC-Kb-Gen (*CLCNKB*)

Bei dem Chloridkanal ClC-Kb handelt es sich wie bereits erwähnt um einen basolateral gelegenen Chloridionenkanal. Dieser spielt eine wichtige Rolle bei der Chloridreabsorption im aufsteigenden Teil der Henleschen Schleife und dem distalen Tubulus. Der Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporter erhöht die intrazelluläre Chloridkonzentration durch Absorption dieser Ionen aus dem Tubuluslumen. Um das Chloridgleichgewicht zwischen intra- und extrazellulär aufrechtzuerhalten, verlassen Chloridionen die Zellen zum einen über einen basolateralen (dem Blut zugewandten) Kalium-Chlorid-Kotransporter, zum anderen über die basolateral gelegenen Chloridkanäle ClC-Ka und ClC-kb. Bei einem Defekt des ClC-Kb wird somit auch der Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporter in seiner Funktion eingeschränkt. Dies hat sowohl Auswirkungen auf die Chlorid- als auch auf die Kalium- und Natriumhomöostase in der Niere (siehe auch Abbildung 1.1).
Die Funktion des ClC-Kb wird maßgeblich vom extrazellulären pH-Wert und der extrazellulären Kalziumkonzentration beeinflusst. So führen niedrige pH-Werte bzw. niedrige Kalziumkonzentrationen zu dessen Inhibition [WALDEGGER et al. 2002]. Die funktionelle Einheit von Barttin (siehe Kapitel 1.2.3.4) und ClC-Kb reagiert dabei sensitiver auf pH-Wertänderungen als auf Schwankungen des extrazellulären Kalziums [ESTÉVEZ et al. 2001].
Das Protein bildet insgesamt 18 α-Helices aus, von denen sich 16 als Transmembrandomänen darstellen und die 1. und 18. intrazellulär gelegen sind. Bei dem Protein handelt es sich um ein Homodimer mit zwei senkrecht zur

Membranoberfläche verlaufenden Achsen. Jede der beiden Untereinheiten formt ihre eigene Pore und besitzt eine antiparallele Architektur. Die Anionenselektiviät wird durch das Zusammenbringen von Aminosäuren aus vier verschiedenen Bereichen des Proteins im Zentrum der Membran gewährleistet. Diese Regionen sind in den ClC-Chloridkanälen hoch konserviert und umfassen die Sequenzen GSGIP (AS 120-124), GKVGP (AS 164-168) und GYFMP (AS 424-428) sowie das Tyrosin an AS-Position 520. [DUTZLER et al. 2002].

Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen die Auffassung, dass Mutationen im Bereich des ClC-Kb in einem direkten Zusammenhang mit der klassischen Form des Bartter-Syndroms stehen, obgleich sich auch in diesem Kollektiv solche Patienten finden, die sich nicht eindeutig einer der Varianten des Bartter-Syndroms zuordnen lassen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten mehrere Deletionen beschrieben werden. Bereits frühere Untersuchungen dieses Kanals zeigten ein ungewöhnlich häufiges Auftreten von Deletionen, welches wahrscheinlich durch die hohe Sequenzhomologie von ClC-Ka und ClC-Kb zu erklären ist. Man vermutet als Ursache ein ungleiches Cross-over zwischen beiden Kanälen, da diese im Genom unmittelbar hintereinander gelegen sind [SIMON et al. 1997], [KONRAD et al. 2000].

### 4.2.1 Mutationen im *ClC-Kb*

Im Folgenden werden 9 Mutationen, die im Rahmen dieser Arbeit identifiziert werden konnten, diskutiert. Dabei handelt es sich um 8 heterozygote und 1 homozygote Mutation, die als Punktmutationen, Deletionen bzw. als Insertion vorliegen. Eine Mutation konnte im Bereich eines Splice-acceptors gezeigt werden. Keine dieser Mutationen konnte in dem aus 50 Personen (= 100 Allele) bestehenden Kontrollkollektiv gefunden werden. Bei zwei der insgesamt vier beschriebenen Deletionen handelt es sich um Deletionen des gesamten Kanals, eine ist mit einer Insertion und einer Punktmutation kombiniert.

Eine graphische Übersicht über die Lokalisation der Mutationen gibt die Abbildung 4.2.

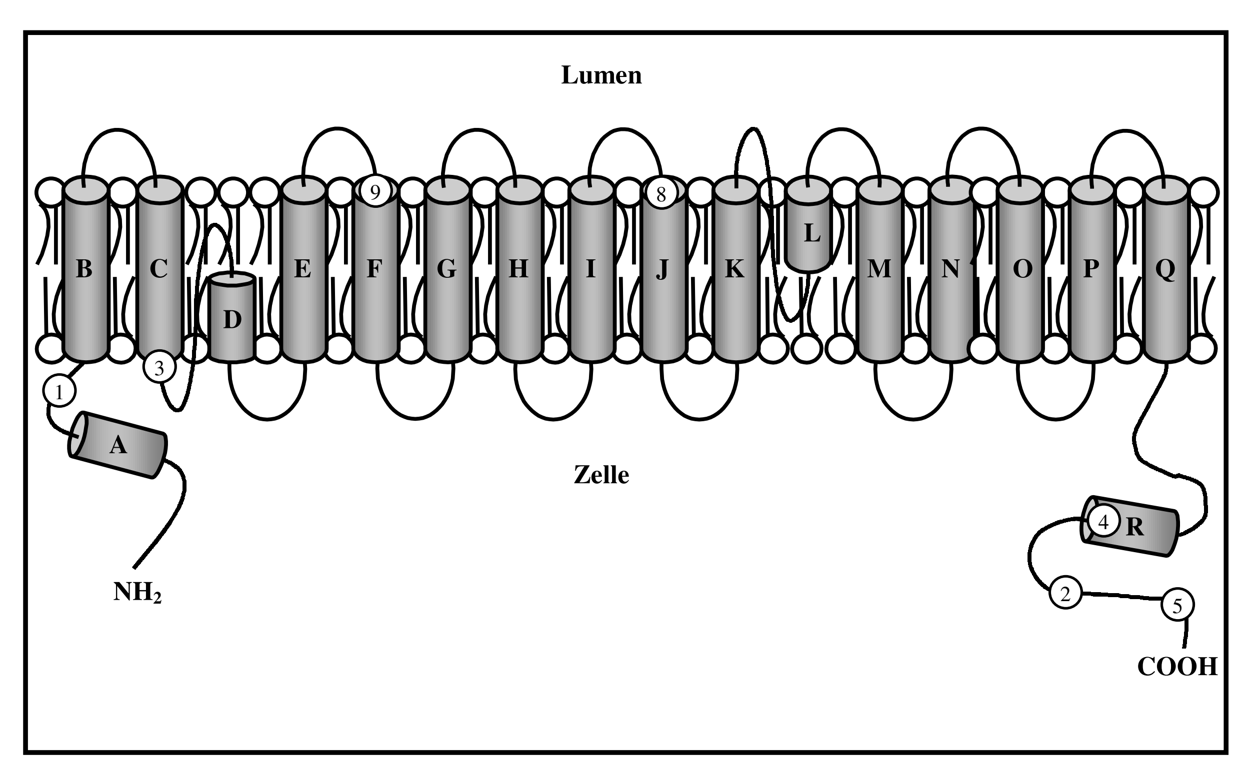



**Abbildung 4.2** Strukturmodell des ClC-Kb (nach: Dutzler et al. 2002). Die Zahlen in den Kreisen zeigen die Lokalisation der Mutationen innerhalb des Chlorid-Kanals und entsprechen der Nummer der Mutation laut Tabelle 3.6. Bei den Mutationen # 6 und # 7 handelt es sich um Deletionen aller Exone; sie sind daher in der Abbildung nicht dargestellt.

Die Diskussion der Mutationen gestaltet sich sicher schwieriger als die im Bereich des ROMK, da bislang keine Daten zur Expression einzelner Mutationen veröffentlicht sind. Nach der Beschreibung von Barttin und dessen Stellenwert hinsichtlich der Funktion des ClC-Kb [WALDEGGER et al. 2002] ist es inzwischen möglich, den Kanal (hClC-kb) funktionell zu exprimieren und entsprechende Untersuchungen daran durchzuführen.

Bei der Mutation # 1 der Patientin P119 handelt es sich um eine heterozygote Punktmutation. Durch den Austausch eines Cytosin gegen ein Thymin entsteht bereits an gleicher Stelle ein Stop-Kodon (R33Stop (opal)). Die Folge dieses Kettenabbruchs noch vor der ersten Transmembrandomäne ist der Wegfall von 654 Aminosäuren und somit die Entstehung eines trunkierten Proteins. Es ist daher sicher davon auszugehen, dass das verkürzte Protein keinerlei Kanalrestfunktion besitzt.
Auch bei der Mutation # 2 der Patientin entsteht durch Basenaustausch ein vorzeitiges Stop-Kodon (E606Stop (amber)). Dieses befindet sich im Bereich des C-Terminus. Das entstandene Protein ist um 81 Aminosäuren verkürzt.

Obgleich die α-Helix R keine Transmembrandomäne darstellt, sondern im Zytoplasma liegt, scheint diese eine wichtige Rolle in Bezug auf die Kanalfunktion zu spielen. Es wird diskutiert, ob die Regulation der Kanalfunktion möglicherweise durch Prozesse im Zytoplasma direkt von der α-Helix R beeinflusst wird [DUTZLER et al. 2002]. Weitere Untersuchungen des ClC-Kb haben gezeigt, dass die Aktivität des Kanals durch Veränderung des C-Terminus verändert wird. Dabei wurden Teile des C-Terminus des ClC-Kb durch Segmente des ClC-K1 von Ratten ersetzt [WALDEGGER u. JENTSCH 2000]. Auch wenn die angeführten Ergebnisse verschiedener Untersuchungen die Pathogenität dieser Mutation nicht beweisen, so lässt sich eine Veränderung der Kanalfunktion aufgrund dieser Mutation vermuten.

Der Patient Marb. 7468 ist Träger zweier heterozygoter Mutationen. Bei der Mutation # 3 handelt es sich um eine komplexe Mutation. Sie besteht aus einer 9 Basenpaare langen Insertion einer unmittelbar vorausgegangenen Sequenz. Daran schließen sich eine Deletion von 12 Basenpaaren sowie eine Punktmutation an. Eine genaue schematische Darstellung zeigt Abbildung 3.25. Insgesamt entsteht ein um eine Aminosäure verkürztes Protein.
Das Zustandekommen einer solchen Mutation lässt sich durch die beiden in der Folge angeführten Thesen erklären. Die wahrscheinlichere der beiden sei vorangestellt.
Unmittelbar vor der beschriebenen Insertion (TCA GGC TTC) findet sich die gleiche Basenfolge bereits schon einmal. Der Patient zeigt an dieser Stelle im Vergleich zum Wildtyp eine stumme Mutation G324A. Daher liegt bei dem Patienten zumindest auf einem Allel ebenfalls die Basenfolge TCA GGC TTC vor, wie sie sich sowohl im ClC-Ka als auch in der Insertion zeigt. Man kann daher postulieren, dass die Insertion ein Duplikat dieser Basenfolge darstellt. Das Auftreten der beschriebenen Punktmutation lässt sich mit diesem Modell hingegen nicht erklären und scheint daher zusätzlich zu bestehen.
Es besteht eine zweite theoretische Möglichkeit für das Zustandekommen dieser Mutation. Es ist denkbar, dass es zu einem ungleichen Crossing-over zwischen A- und B-Kanal aufgrund ihrer hohen Sequenzhomologie kommt [SIMON et al. 1997], [KONRAD et al. 2000]. Übertragen auf diese Mutation bedeutet dies, dass es sich bei der Insertion um eine deletierte Sequenz des

ClC-Ka handelt und die Deletion im A-Kanal des Patienten als 12 Basenpaare lange Insertion erscheint. Auffällig ist, dass im Falle dieser Mutation die Insertion mit dem Basentriplett TCA beginnt. Der Wildtyp des ClC-Kb zeigt an dieser Stelle ein TCG, der ClC-Ka allerdings ebenfalls ein TCA. Dieser Aspekt unterstreicht die Möglichkeit eines ungleichen Cross-overs zwischen beiden Kanälen. Die an Position 346 gezeigte Punktmutation (P116T) lässt sich hingegen mit keinem der beiden Modelle erklären. Sie scheint daher nicht in einem kausalen Zusammenhang mit dem Rest der Mutation zu stehen.
Es ist aufgrund der Komplexität der Mutation davon auszugehen, dass sie einen Einfluss auf die Kanalfunktion haben wird, zumal sie in der Nähe des GSGIP-Motivs liegt, welches eine wichtige Rolle in Bezug auf die Ionenselektivität zu haben scheint. Eine Mutation des Serins in diesem Motiv führte bei *Salmonella typhimurium* zu einer Veränderung der Ionenselektivität und einer massiven Reduktion der Durchlässigkeit des Kanals [DUTZLER et al. 2002].
Es konnte bei dem Patienten Marb. 7468 noch eine weitere heterozygote Punktmutation gefunden werden (Mutation # 4). Auch in diesem Fall entsteht durch Basensubstitution ein Stop-Kodon (Y531Stop (ochre)) mit der Folge der Entstehung eines um 156 Aminosäuren kürzeren Proteins. Die Mutation ist im Bereich der α-Helix R lokalisiert. Das N-terminale Ende dieser Helix liegt direkt am Selektivitätsfilter des Kanals, wobei das an Aminosäureposition 520 gelegene Tyrosin direkt mit dem Chloridion interagiert. Das C-terminale Ende der Helix ragt ins Zytoplasma. Der α-Helix R wird daher eine entscheidende Rolle bezüglich der Kanalfunktion zugeschrieben [DUTZLER et al. 2002]. Die Veränderung dieser Struktur infolge der Ausbildung eines vorzeitigen Stop-Kodons lässt daher vermuten, dass die Kanalfunktion beeinträchtigt sein wird.

Beim Patienten Marb. 7438 konnte bislang lediglich eine heterozygote Punktmutation (Mutation # 5) beschrieben werden (C626Y). Diese befindet sich im Bereich des C-Terminus, 92 Aminosäuren hinter dem Ende der Helix R. Bislang unveröffentlichte Daten der Expression dieser Mutation durch Waldegger et al. in Oocyten zeigen, dass diese Mutation zu keiner Änderung der Kanalfunktion führt. Dieser Aspekt bietet eine mögliche Erklärung für den abweichenden Phänotyp, denn im Bereich des ClC-Kb konnte lediglich diese Mutation gefunden werden. Es ist daher entweder davon auszugehen, dass die

relevanten Mutationen erneut im Bereich der Kandidatenkänale zu suchen sind bzw. ein weiterer bislang noch nicht beschriebener Kandidatenkanal existiert oder angesichts des abweichenden Phänotyps ein anderes Gen verantwortlich ist.
Klinisch zeigt dieser Patient wie bereits erwähnt das Bild eines Hyperprostaglandin E-Syndromes mit metabolischer Alkalose, Hypokaliämie, Hyperkalziurie und Nephrokalzinose.

Bei der Mutation # 6 der Patientin Marb. 7089 handelt es sich um eine homozygote Deletion aller 19 Exone des ClC-Kb. Das entsprechende Kanalprotein fehlt daher vollständig, eine Funktion ist folglich nicht vorhanden.
Klinisch findet man bei der Patientin eine deutlich ausgeprägte metabolische Alkalose, hingegen aber ein normales Serum-Kalium. Eine Hyperkalziurie und Nephrokalzinose fehlen.

Im Fall der Patientin Marb. 7491 findet sich ebenfalls eine Deletion sämtlicher Exone des ClC-Kb (Mutation # 7) und damit das Fehlen des Proteins. Allerdings liegt diese Mutation heterozygot vor.
Um zu klären, ob es sich bei solchen Patienten um eine Deletion oder eine Genkonversion handelt, muss man die Zahl der Allele vergleichen. Im Fall einer heterozygoten Deletion besitzt ein Patient zwei Allele des ClC-Ka und nur eines des ClC-Kb (Verhältnis 2:1), handelt es sich hingegen um eine Genkonversion liegt ein Verhältnis von 3:1 vor. Untersuchungen solcher Patienten zeigen ein Verhältnis von 1,97:1 (Standardabweichung 0,12; Konfidenzintervall 1,87-2,10:1) [SIMON et al. 1997]. Die Untersuchungen zeigen, dass das Auftreten von Deletionen deutlich häufiger ist als das einer Genkonversion. So lässt sich auch im Falle dieser Patientin vermuten, dass es sich um eine Deletion handelt.
Neben dieser konnte bei der Patientin eine weitere heterozygote Deletion von fünf Basenpaaren (Mutation # 8) beschrieben werden. Bedingt durch die komplette Deletion eines Allels erscheint diese Mutation hemizygot. Im Protein ist die Mutation zu Beginn der α-Helix J lokalisiert. Die Mutation führt zu einer Verschiebung des Leserrasters und zur Entstehung eines vorzeitigen Stop-Kodons (R312Stop(amber)). Dadurch kommt es zum Kettenabbruch und mit der Folge der Bildung eines um 375 Aminosäuren kürzeren Proteins. Aufgrund

des langstreckigen Verlustes von Aminosäuren ist sicherlich von einem Funktionsverlust des Kanals auszugehen.

Bei der Patientin P106 konnte im Rahmen dieser Arbeit nur eine heterozygote Mutation entdeckt werden (Mutation # 9). Es handelt sich dabei um eine Punktmutation im Bereich einer Splice-site, die sich unmittelbar dem Exon 4 anschließt (Intron4 498+1). Durch fehlerhaftes Splicen der DNA in diesem Bereich kommt es möglicherweise zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz mit der Folge eines Verlustes nachfolgender Exone oder einer Verschiebung des Leserasters. Zu Beginn des Exons 5 findet sich ein hochkonserviertes GKVGP-Motiv, welches eine wichtige Rolle hinsichtlich der Kanalfunktion und der Ionenselektivität zu spielen scheint [WALDEGGER u. JENTSCH 2000], [DUTZLER et al. 2002]. Im Falle einer Verschiebung des Leserasters ist eine Veränderung der Kanaleigenschaften durch eine Mutation in dieser Region wahrscheinlich.

Eine Korrelation von klinischen Daten und der Art der Mutation sind bislang rein hypothetisch. Die klinischen Daten der untersuchten Patienten zeigen in allen Fällen eine metabolische Alkalose und eine verschieden stark ausgeprägte Hypokaliämie. Mit Ausnahme des Patienten Marb. 7438 (Mutation #5) zeigt keiner der Patienten eine Hyperkalziurie und eine Nephrokalzinose. Die Untersuchungen des ClC-Kb haben dessen Rolle hinsichtlich der Genese des klassischen Bartter-Syndroms und damit dessen Bedeutung als eigene Entität unterstreichen können. Um Phäno- und Genotyp sicherer miteinander zu korrelieren, sind weitere Untersuchungen und genauere klinische Daten erforderlich. Neue Aspekte liefert eventuell die inzwischen bestehende Möglichkeit, den hClC-Kb zu exprimieren und Veränderungen der Kanalfunktion im Falle einzelner Mutationen genauer zu beschreiben.

## 4.3 Pathophysiologie

Im dicken aufsteigenden Teil der Henleschen Schleife wird die Natrium-Chlorid-Rückresorption maßgeblich durch die Funktion des furosemidsensiblen Natrium-Kalium-2 Chlorid-Kotransporters, dem NKCC2, bestimmt. Wichtig für dessen Funktion sind verschiedene andere Kanäle, unter anderem der apikal gelegene Kaliumkanal ROMK und der basolaterale Chloridkanal ClC-Kb.
Anhand der in Kapitel 1 beschriebenen Physiologie der Elektrolytrückresorption im Bereich der Henleschen Schleife lassen sich die klinischen Phänomene bei Patienten mit HPS erklären.
Eine gestörte Elektrolytresorption im dicken aufsteigenden Teil der Henleschen Schleife mit daraus resultierendem Salz- und Volumenverlust führt zu einer Abnahme der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und des renalen Blutflusses. Als Gegenregulation wird zur Aufrechterhaltung der Nierenfunktion das vasodilatierende $PGE_2$ freigesetzt. Eine direkte Stimulation durch $PGE_2$ und ein tubuloglomeruläres Feedback führen zur Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. Der resultierende sekundäre Hyperaldosteronismus führt einerseits zur Natriumrückresorption, ist aber andererseits auch für die typische Hypokaliämie verantwortlich. Eine Störung der Elektrolytresorption führt ferner zu einer unzureichenden Kalziumrückresorption und daher zu einer vermehrten Ausscheidung mit dem Urin. Es resultieren die für das HPS typische Hyperkalziurie und die konsekutive Nephrokalzinose [SEYBERTH et al. 1998].
Die entscheidende Rolle des $PGE_2$ wird zudem durch die Erfolge der Therapie der betroffenen Kinder mit Zyklooxygenase-Hemmern deutlich. So reduziert die Therapie mit Indometacin die durch das $PGE_2$ hervorgerufenen Symptome, wie u.a. Übelkeit, Erbrechen, Fieber, Wachstumsretardierung und Hypokaliämie, deutlich.
Die klinischen Symptome des cBS sind, wie bereits in Kapitel 1 erwähnt, deutlich weniger genau abgegrenzt. Es sind verschiedene Faktoren, die für diese Variabilität verantwortlich sind. Der ROMK und NKCC2 sind in der apikalen Membran im dicken aufsteigenden Teil der Henleschen Schleife exprimiert und sind aufgrund ihrer physiologischen Koppelung für ca. 50% des NaCl-Transportes in diesem Bereich verantwortlich. Im Bereich der basolateralen Membran gibt es hingegen verschiedene Kanäle, über die Chlorid

die Tubuluszelle verlassen kann, der ClC-Kb stellt somit nur einen möglichen Transportweg dar. Zu erwähnen sind z.B. der Kalium-Chlorid-Kotransporter, der Cystische Fibrose Transmembran Regulator (CFTR) und der ClC-Ka. Es ist daher möglich, dass diese alternativen Transportwege die basolaterale Chloridausscheidung im Falle eines Defektes des ClC-Kb in unterschiedlichem Maße kompensieren und somit verantwortlich für die Variabilität der klinischen Symptome beim klassischen Bartter-Syndrom sind.

Zudem gibt es die Vermutung, dass das Ausmaß der Reduzierung des NaCl-Transportes im dicken aufsteigenden Teil der Henleschen Schleife und die damit verbundene Reduktion des lumenpositiven Potentials möglicherweise einen direkten Einfluss auf die Höhe der Kalzium- und Magnesiumausscheidung mit dem Urin hat [KONRAD et al. 2000]. Diese These würde einen Erklärungsansatz dafür liefern, dass die beim HPS mit großer Konstanz gefundene Hyperkalziurie und Nephrokalzinose bei Kindern mit cBS fehlt.

## 4.4 Schlussbetrachtung

Insgesamt konnten im Rahmen dieser Arbeit 19 Mutationen im Bereich des ROMK-Gens (*KCNJ1*) und 9 Mutationen im Bereich des ClC-Kb-Gens (*CLCNKB*) lokalisiert und beschrieben werden.

Die Ergebnisse der Mutationsanalysen im Bereich des ROMK zeigen eindeutig dessen pathogenetische Bedeutung bei der Entstehung eines HPS. Alle Patienten, bei denen Mutationen in diesem Gen gefunden wurden, sind vorher aufgrund der klinischen Parameter dem HPS zugeordnet worden. Das Vorliegen eines Polyhydramnions und einer Nephrokalzinose ermöglicht die Abgrenzung von anderen Entitäten aus der Gruppe der Salzverlust-Tubulopathien. Alle Patienten, bei denen im Rahmen dieser Arbeit eine Mutation im ROMK gefunden werden konnte, zeigten diese beiden Symptome.

Durch Expression einiger der im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Mutationen konnten deren Auswirkung auf die Kanalfunktion und die damit verbundene Bedeutung an der Entstehung eines HPS eindrücklich aufgezeigt werden.

Sowohl in dieser Arbeit als auch bei Untersuchungen von Feldmann et al. wurden Mutationen im Bereich der Exone 1 und 2 gefunden, die zum klinischen Bild des HPS führen. Der genaue Pathomechanismus der Entstehung des HPS aufgrund dieser Mutationen ist noch nicht abschließend geklärt, einen interessanten Erklärungsansatz bietet allerdings die im Zusammenhang mit der Diskussion der Mutationen genannte mögliche Kompensation der Symptome durch die intakte Ausbildung eines ROMK1 im Bereich des Sammelrohrs.
Die Ergebnisse der Untersuchung des Chloridkanals ClC-Kb unterstreichen die pathogenetische Bedeutung bei der Entstehung des klassischen Bartter-Syndroms und trotz aller Heterogenität dessen Stellung als eigene Entität in der Gruppe der Patienten mit einer Bartter-Symptomatologie. So wurden vor der genetischen Untersuchung fünf der sechs Patienten dem cBS zugeordnet und lediglich einer als HPS klassifiziert. Wie bereits im Rahmen der Diskussion dieser Mutation besprochen, zeigte die Expression dieser Mutation eine unauffällige Kanalfunktion, sodass man die Pathogenität anzweifeln muss. Die Vermutung liegt daher nahe, dass die bei diesem Patienten relevanten Mutationen wohl doch im Bereich des ROMK oder anderer für das Auftreten eines HPS verantwortlichen Elektrolytkanäle zu suchen sind. Möglich ist allerdings auch, dass sich der Defekt in einem anderen Protein befindet, das bislang noch nicht mit dem HPS in Verbindung gebracht wurde.
Einen weiteren wichtigen Schritt in Richtung der Untersuchung des cBS bietet sicherlich die Beschreibung des Barttin-Proteins als unentbehrlicher Bestandteil der funktionsfähigen Einheit des Chloridkanals [WALDEGGER u. JENSTCH 2000]. So ist es zukünftig möglich, die beschriebenen Mutationen zu exprimieren, elektrophysiologisch zu untersuchen und dadurch deren Bedeutung hinsichtlich der Kanalfunktion zu beschreiben.

Die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Mutationen unterstreichen die pathogenetische Bedeutung des Kaliumkanals ROMK und die des Chloridkanals ClC-Kb bei der Entstehung des HPS bzw. cBS. Es bleibt allerdings festzustellen, dass nur bei einem Teil der Patienten des untersuchten Kollektivs Mutationen beschrieben werden konnten. Dies rechtfertigt die Annahme, dass neben den bislang beschriebenen Kandidatengenen für die verschiedenen Entitäten des Bartter-Syndroms noch mindestens ein weiteres

Gen existiert. Weitere molekulargenetische Untersuchungen auf diesem Gebiet sind zur endgültigen Aufklärung dieses vielschichtigen Krankheitsbildes erforderlich und sinnvoll.

# 5 Zusammenfassung

Der Begriff Bartter-Syndrom stellt den historisch bedingten Sammelbegriff für einige hereditäre Tubulopathien dar, denen eine chronische hypokaliämische metabolische Alkalose gemein ist. Heutzutage wird das Bartter-Syndrom in phänotypisch unterschiedliche Varianten aufgeteilt: 1. Die antenatale hyperkalziurische Form oder das *Hyperprostaglandin-E-Syndrom* (HPS), 2. das *klassische Bartter-Syndrom* (cBS), 3. die hypokalziurisch-hypomagnesiämische Variante oder *Gitelman-Syndrom* (GS) und 4. die antenatale hyperkalziurische Form (HPS) mit Taubheit (BSND-Bartter-syndrome with sensorineuronal deafness). Bezüglich des Erbgangs geht man aufgrund der familiären Häufung, der ausgeglichenen Geschlechterverteilung und des vermehrten Auftretens bei blutsverwandten (konsanguinen) Familien von einer autosomal-rezessiven Vererbung aus.

Im Vordergrund der Arbeit stand die Mutationssuche und deren Analyse bei insgesamt 71 Patienten, von denen 34 das phänotypische Bild eines HPS und 22 das des cBS zeigten. 15 Patienten konnten klinisch keiner der beiden Gruppen eindeutig zugeordnet werden und wurden somit auf Mutationen in beiden unten angeführten Kanälen untersucht.

Im ersten Teil wurde das Gen *KCNJ1*, welches für ROMK, einen apikal gelegenen Kaliumkanal im dicken Teil der Henleschen Schleife, kodiert, untersucht. Patienten mit Mutationen in diesem Kanal zeigen klinisch das Bild des HPS. Insgesamt konnten 19 relevante Mutationen beschrieben werden, wobei sich sowohl homozygote (5) als auch heterozygote (14) Mutationen fanden. Dabei handelte es sich um Punktmutationen (14), Deletionen (4) und eine Insertion.
Hervorzuheben sind im Bereich des ROMK die Mutationen #13 und #14, bei denen es sich in beiden Fällen um homozygote Deletionen im Bereich der Exone 1 und 2 handelt. Obgleich beide Patienten einen funktionsfähigen ROMK1 exprimieren, entwickelten sie eine schwere Fehlfunktion im Bereich

des dicken aufsteigenden Teils der Henleschen Schleife (TAL). Diese Tatsache unterstreicht die Bedeutung der anderen ROMK-Isoformen und lässt vermuten, dass diese beiden Patienten einen milderen klinischen Ausprägungsgrad des HPS ohne entsprechende Therapie zeigen würden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde das *ClC-Kb*-Gen, welches für den basolateralen Chloridkanal ClC-Kb im dicken aufsteigenden Teil der Henleschen Schleife kodiert, untersucht. Patienten mit einem solchen Kanaldefekt lassen sich phänotypisch dem cBS zuordnen. Es fanden sich 9 relevante Mutationen. Auch hier fanden sich sowohl heterozygote (8) als auch homozygote (1) Mutationen, von denen fünf Punktmutationen und drei Deletionen waren. Eine Mutationen erscheint als eine Kombination aus einer Insertion, einer Deletion und einer Punktmutation.
Die Mutation #3 erscheint aufgrund ihrer Komplexität (Deletion von 12 bp, Insertion von 9 bp und eine Punktmutation) von besonderem Interesse, da es für das Zustandekommen verschiedene Interpretationsansätze gibt. Am wahrscheinlichsten ist es, dass die Insertion ein Duplikat einer vorangegangenen Basenfolge ist.

Das Hauptziel beider Mutationsanalysen war es, die Bedeutung von ROMK und ClC-Kb in Bezug auf die Pathogenese des HPS bzw. cBS zu unterstreichen. Die große Anzahl der beschriebenen relevanten Mutationen ist ein Beleg für die herausragende Rolle beider Kanäle hinsichtlich dieser Bedeutung.
Ferner sollten mögliche Korrelationen der Art der Mutation mit dem Schweregrad der klinischen Ausprägung einer der beiden Phänotypen aufgezeigt werden. Dies war zum einem aufgrund der vorliegenden klinischen Daten zum anderen aufgrund der unmittelbar nach der Geburt begonnenen Behandlung der pränatal diagnostizierten Patienten in den meisten Fällen nicht in anderen nur bedingt möglich.
Es bleibt festzustellen, dass nur bei einem Teil der Patienten des untersuchten Kollektivs Mutationen beschrieben werden konnten. Dies rechtfertigt die Annahme, dass neben den bislang beschriebenen Kandidatengenen für die verschiedenen Entitäten des Bartter-Syndroms noch mindestens ein weiteres Gen existiert.

# 6 Literaturverzeichnis

Bartter FC, Pronove P, Gill jr. JR, MacCardle RC
*Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis. A new syndrome*
Am. J. Med. 33: 811-828, 1962

Bettinelli A, Bianchetti MG, Girardin E, Caringella A, Cecconi M, Appiani AC, Pavanello L, Gastaldi R, Isimbaldi C, Lama G, Marchesoni C, Matteuci C, Patriarca P, Di Natale B, Setzu C, Vitucci P
*Use of calcium excretion values to distinguish two forms of primary renal tubular hypokalemic alkalosis: Bartter and Gitelman syndromes*
J. Paediatr. 120: 38-43, 1992

Bettinelli A, Biachetti MG, Borella P, Volpini E, Metta MG, Basilico E, Selicorni A, Bargellini A, Grassi MR
*Genetic heterogeneity in tubular hypomagnesemia-hypokalemia with hypocalciuria (Gitelman`s syndrome)*
Kidney Int. 47: 547-551, 1995

Birkenhäger R, Otto E, Schürmann MJ, Vollmer M, Ruf EM, Maier-Lutz I, Beekmann F, Fekete A, Omran H, Feldmann D, Milford DV, Jeck N, Konrad M, Landau D, Knoers N, Antignac C, Sudbrak R, Kispert A, Hildebrandt F
*Mutation of BSND causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure*
Nature Gen., 2001

Boim MA, Ho K, Shuck ME, Bienkowski MJ, Block JH, Slightom JL, Yang Y, Brenner BM, Hebert SC
*ROMK inwardly rectifying ATP-sensitive $K^+$channel. II. Cloning and distribution of alternative forms*
Am. J. Physiol. 268: F1132-F1140, 1995

Brandt S, Jentsch TJ
*ClC-6 and ClC-7 are novel broadly expressed members of the ClC channel family*
FEBS Letters 377: 15-20, 1995

Brennan TMH, Landau D, Shalev H, Lamb F, Schutte BC, Walder RY, Mark AL, Carmi R, Sheffield VC
*Linkage of infantile Bartter syndrome with sensorineural deafness to chromosome 1p*
Am. J. Hum. Genet. 62: 355-361, 1998

Cid LP, Montrose-Rafizadeh C, Smith DI, Guggino WB, Cutting GR
*Cloning of a putative human voltage-gated chloride channel (ClC-2) cDNA widely expressed in human tissues*
Human Mol. Gen. 4, No 3: 407-413, 1995

Clive DM
*Bartter`s syndrome: The unsolved puzzle*
Am. J. Kidney Dis. 25: 813-823, 1995

Cruz DN, Shaer AJ, Bia AJ, Lifton RP, Simon DB
*Gitelman`s syndrome revisited: An evaluation of symptoms and health-related quality of life*
Kidney Intern. 59: 710-717, 2001

Derst C, Konrad M, Köckerling A, Károlyi L, Deschênes G, Daut J, Karschin A, Seyberth HW
*Mutations in the ROMK gene in antenatal Bartter syndrome are associated with impaired $K^+$ channel function*
Biochem. Biophys. Res. Commun. 203: 641-645, 1997

Derst C, Wischmeyer E, Preisig-Müller R, Spauschus A, Konrad M, Hensen P, Jeck N, Seyberth HW, Daut J, Karschin A
*A Hyperprostaglandin E syndrome mutation in Kir 1.1 (renal outer medullary potassium) channels reveals a crucial residue for channel function in Kir 1.3 channels*
J. Biol. Chem. 273: 23884-23891, 1998

Doyle DA, Cabral JM, Pfuetzner RA, Kuo AK, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R
*The structure of the potassium channel: molecular basis of $K^+$ conduction and selectivity*
Science 280: 69-77, 1998

Dutzler R, Campbell EB, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R
*X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity*
Nature 415, No 17: 287-294, 2002

Estévez R, Boettger T, Stein V, Birkenhäger R, Otto E, Hildebrandt F, Jentsch TJ
*Barttin is a $Cl^-$ channel ß-subunit crucial for renal $Cl^-$ reabsorption and inner ear $K^+$ secretion*
Nature 414: 558-561, 2001

Fanconi A, Schachenmann G, Nüssli R, Prader A
*Chronic hypokalaemia with growth retardation, normotensive hyperrenin-hyperaldosteronism („Bartter`s syndrome“), and hypercalciuria*
Helv. Pediatr. Acta 2: 144-163, 1971

Feldmann D, Alessandri JL, Deschênes G
*Large Deletion of the 5`End of the ROMK1 Gene Causes Antenatal Bartter Syndrome*
J. Am. Soc. Nephrol. 9: 2357-2359, 1998

Gamba G, Saltzberg SN, Lombardi M, Miyanoshita A, Lytton J, Hediger MA, Brenner BM, Hebert SC
*Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2749-2753, 1993

Gamba G, Saltzberg SN, Lombardi M, Lytton J, Hediger MA, Brenner BM, Hebert SC
*Molecular cloning, primary structure and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in the kidney*
J. Biol. Chem. 269: 17713-17722, 1994

Giebisch G, Wang W
*Bartter`s syndrome: a disorder characterized by high urinary prostaglandins and a dependence of hyperreninemia on prostaglandin synthesis*
Kidney Int. 49: 1624-1631, 1996

Gill Jr. JR, Bartter FC
*Evidence for a prostaglandin-independent defect in chloride reabsorption in the loop of Henle as a proximal cause of Bartter`s syndrome*
Am. J. Med. 65: 766-772, 1978

Gitelman HJ, Graham JB, Welt LG
*A new familial disorder characterized by hypokalaemia and hypomagnesaemia*
Trans. Assoc. Am. Physicians 79: 221-235, 1966

Gitelman HJ
*Hypokalaemia, hypomagnesiaemia, and alkalosis: A rose is a rose-or is it?*
J. Paediatr. 120: 79-80, 1992

Greger R
*Renale Wirkmechanismen der Diuretika*
Nieren- und Hochdruckkrankheiten 25: 136-146, 1996

Guay-Woodford LM
*Bartter syndrome: Unraveling the pathophysiologic enigma*
Am. J. Med. 105: 151-161, 1998

Hebert SC, Friedman P, Andreoli TE
*The effects of antidiuretic hormone on cellular conductive pathways in mouse medullary thick ascending limbs of Henle. I. ADH increases transcellular conductance pathways*
J. Membrane Biol. 80: 201-219, 1984

Hensen P
*Molekulare Genetik der hereditären hypokaliämischen Tubulopathien*
Inaugural-Dissertation: 1-108, 1999

Heukeshoven J, Dernick R
*Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining*
Electrophoresis 6: 103-112, 1985

Ho K, Nichols CG, Lederer WJ, Lytton J, Vassilev PM, Kanazirska MV, Hebert SC
*Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel*
Nature 362: 31-37, 1993

Hunter M
*Ion channels: Accessory to kidney disease*
Nature 414: 502-503, 2001

International Collaborative Study Group for Bartter-like syndromes (ICSBS), consisting of: Károlyi L, Konrad M, Köckerling A, Ziegler A, Zimmermann DK, Roth B. Wieg C, Grzeschik KH, Koch MC, Seyberth HW, Vargas R, Forestier L, Jean G, Deschaux M, Rizzoni GF, Niaudet P, Antignac C, Feldmann D, Lorridon F, Cougoureux E, Laroze F, Alessandri JL, David L, Saunier P, Deschênes G, Hildebrandt F, Vollmer M, Proesmans W, Brandis M, Heuvel LPWJ van den, Lemmink HH, Nillesen W, Monnens LAH, Knoers NVAM, Guay-Woodford LM, Wright CJ, Madrigal G, Hebert SC
*Mutations in the gene encoding the inwardly-rectifying rebal potassium channel, ROMK, cause the antenatal variant of Bartter syndrome: evidence for genetic heterogeneity*
Hum. Mol. Gen. 6, No 1: 17-26, 1997

Isomoto S, Chikako K, Kurachi Y
*Inwardly rectifying potassium channels: Their molecular heterogeneity and function*
Jap. J. Physiol. 47: 11-39, 1997

Jeck N, Reinalter S, Henne T, Marg W, Mallmann R, Pasel K, Vollmer M, Klaus G, Leonhardt A, Seyberth HW, Konrad M
*Hypokalemic salt-losting tubulopathy with chronic renal failure and sensorineuronal deafness*
Peditrics 108: E5, 2001a

Jeck N, Derst C, Wischmeyer E, Ott H, Weber S, Rudin C, Seyberth HW, Daut J, Karschin A, Konrad M
*Functional heterogeneity of ROMK mutations linked to hyperprostaglandin E syndrome*
Kidney Intern. 59: 1803-1811, 2001b

Károlyi L, Ziegler A, Pollak M, Fischbach M, Grzeschik KH, Koch MC, Seyberth HW
*Gitelman`s syndrome is genetically distinct from other forms of Bartter`s syndrome*
Pediatr. Nephrol. 10: 551-554, 1996

Károlyi L, Koch MC, Grzeschik KH, Seyberth HW
*The molecular genetic approach to „Bartter`s syndrome“*
J. Mol. Med. 76: 317-325, 1998

Kieferle S, Fong P, Bens M, Vandewalle A, Jentsch TJ
*Two highly homologous members of the ClC chloride channel family in both rat and human kidney*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 6943-6947, 1994

Köckerling A, Reinalter SC, Seyberth HW
*Impaired response to furosemide therapy in hyperprostaglandin E syndrome: Evidence for a tubular defect in the loop of Henle*
J. Pediatr. 129: 519-528, 1996

Köckerling A, Konrad M, Seyberth HW
*Hereditäre Salzverlusttubulopathien mit Diurektika-ähnlichem Salzverlust*
Dt. Ärzteblatt, Heft 30: A1841-1846, 1998

Konrad M, Vollmer M, Lemmink HH, Van den Heuvel L, Jeck N, Vargas-Poussou R, Lakings A, Ruf R, Deschênes G, Antignac C, Guay-Woodford L, Knoers N, Seyberth HW, Feldmann D, Hildebrandt F
*Mutations in the chloride channel gene CLCNKB as a cause of classic Bartter Syndrome*
J. Am. Soc. Nephrol. 11: 1449-1459, 2000

Krishnan SN, Desai T, Ward DC, Haddad GG
*Isolation and chromosomal localization of a human ATP-regulated potassium channel*
Hum. Genet. 96: 155-160, 1995

Landau D, Shalev H, Ohaly M, Carmi R
*Infantile variant of Bartter syndrome and sensorineuronal deafness. A new autosomal rezessive disorder*
Am. J. Medi. Genet. 59: 454-459, 1995

Lee WS, Hebert SC
*ROMK inwardly rectifying ATP-sensitive K+ channel. I. Expression in rat distal nephron segments*
Am. J. Physiol. 268: F1124-F1131, 1995

Lemmink HH. Heuvel LPWJ van den, Dijk HA van, Merkx GFM, Smilde TJ, Taschner PEM, Monnens LAH, Hebert SC, Knoers NVAM
*Linkage of Gitelman syndrome to the thiazide-sensitive sodium-chloride cotransporter gene with identification of mutations in Dutch families*
Pediatr. Nephrol. 10: 403-407, 1996

Leonhardt A, Timmermanns G, Roth B, Seyberth HW
*Calcium homeostasis and hypercalciuria in hyperprostaglandin E syndrome*
J. Pediatr. 120: 546-554, 1992

López-Nieto CE, Brenner BM
*Molecular basis of inherited disorders of renal solute transport*
Curr. Opin. Nephrol. Hypert. 6: 411-421, 1997

Lüthy C, Bettinelli A, Iselin S, Metta MG, Basilico E, Oetliker OH, Bianchetti MG
*Normal prostaglandinuria $E_2$ in Gitelman`s syndrome, the hypocalciuric variant of Bartter`s syndrome*
Am. J. Kidney Dis. 25: 824-828, 1995

Mackie FE, Hodson EM, Roy LP, Knight JF
*Neonatal Bartter syndrome-use of indomethacin in the newborn period and preservation of growth failure*
Pediatr. Nephrol. 10: 756-758, 1996

Mastroianni N, De Fusco M, Zollo M, Arrigo G, Zuffardi O, Bettinelli A, Ballabio A, Casari G
*Molecular cloning, expression pattern and chromosomal localization of the human Na-Cl thiazide-sensitive cotransporter*
Genomics 35: 486-493, 1996a

Mastroianni N, Bettinelli A, Bianchetti M, Colussi G, De Fusco M, Sereni F, Ballabio A, Casari G
*Novel molecular variants of the Na-Cl cotransporter gene are responsible for Gitelman syndrome*
Am. J. Hum. Genet. 59: 1019-1026, 1996b

Matsumura Y, Uchida S, Kondo Y, Miyazaki H, Ko SBH, Hayama A, Morimoto T, Liu W, Arisawa M, Sasaki S, Marumo F
*Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the CLC-K1 chloride channel*
Nature Genet. 21: 95-98, 1999

Maxam AM, Gilbert W
*A new method for sequencing DNA*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 560-564, 1977

McCredie DA, Rotenberg E, Williams AL
*Hypercalciuria in potassium-losing nephropathy: a variant of Bartter`s syndrome*
Aust. Pediatr. J. 10: 286-295, 1974

McCredie DA
*Variants of Bartter`s syndrome*
Pediatr. Nephrol. 10: 419-421, 1996

McNicholas CM, Wang W, Ho K, Hebert SC, Giebisch G
*Regulation of ROMK1 $K^+$ channel activity involves phosphorylation processes*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 8077-8081, 1994

McNicholas CM, Yang Y, Giebisch G, Hebert SC
*Molecular site for nucleotide binding on an ATP-sensitive renal $K^+$ channel (ROMK2)*
Am. J. Physiol. 271: F275-F285, 1996a

McNicholas CM, Guggino WB, Schwiebert EM, Hebert SC, Giebisch G, Egan ME
*Sensitivity of a renal $K^+$ channel (ROMK2) to the inhibitory sulfonylurea compound glibenclamide is enhanced by coexpression with the ATP-binding cassette transporter cystic fibrosis transmembrane regulator*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8083-8088, 1996b

McNicholas CM, Nason Jr. MW, Guggino WB, Schwiebert EM, Hebert SC, Giebisch G, Egan ME
*A functional CFTR-NBF1 is required for ROMK2-CFTR interaction*
Am. Physiol. Soc.: F843-848, 1997

Mullis KB, Faloona FA
*Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction*
Methods Emzymol. 155: 335-350, 1987

Payne JA, Forbush III B
*Alternativly spliced isoforms of the putative renal Na-K-Cl cotransporter are differentially distributed within the rabbit kidney*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 4544-4548, 1994

Payne JA, Xu JC, Haas M, Lytle CY, Ward D, Forbush III B
*Primary structure, functional expression, and chromosomal localization of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter in human colon*
J. Biol. Chem. 270: 17977-17985, 1995

Peters M, Jeck N, Reinalter S, Leonhardt A, Tönshoff B, Klaus G, Konrad M, Seyberth HW
*Clinical Presentation of genetically defined patients with hypokalemic salt-losing tubulopathies*
Am. J. Med. 112: 183-190, 2002

Proesmans W, Massa G, Vandengerghe K, Assche A van
*Prenatal diagnosis of Bartter syndrome*
Lancet I: 394, 1987

Puschett JB, Greenberg A, Mitro R, Piraino B, Wallia R
*Variant of Bartter`s syndrome with a distal tubular rather than loop of Henle defect*
Nephron 50: 205-211, 1992

ReevesWB, Winters CJ, Zimniak L, Andreoli TE
*Properties and regulation of medullary thick limb basolateral $Cl^-$ channels*
Kidney Intern. 53: Suppl. 65: 24-28, 1998

Rodriguez-Soriano J
*Bartter and related syndromes: the puzzle is almost solved*
Paediatr. Nephrol. 12: 315-327, 1998

Rosenbaum P, Hughes M
*Persistent probably congenital, hypokalaemic metabolic alkalosis with hyaline degeneration of renal tubules and normal urinary aldosterone*
Am. J. Dis. Child. 94: 560, 1957

Rudin A
*Bartter`s syndrome*
Acta Med. Scand. 224: 165-171, 1988

Saito-Ohara F, Uchida S, Takeuchi Y, Sasaki S, Hayashi A, Marumo F, Ikeuchi T
*Assignment of the genes encoding the human chloride channels, CLCNKA and CLCNKB, to 1p36 and of the CLCN3 to 4q32-q33 by in situ hybridization*
Genomics 36: 372-374, 1996

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR
*DNA sequencing with chain terminating inhibitors*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467, 1977

Scheinman SJ
*X-linked hypercalciuric nephrolithiasis: Clinical symptoms and chloride channel mutations*
Kidney Intern. 53: 3-17, 1998

Schulte U, Hahn H, Konrad M, Jeck N, Derst C, Wild K, Weidemann S, Ruppersberg JP, Fakler B, Ludwig J
*pH gating of ROMK ($K_{ir}$ 1.1) channels: Control by an Arg-Lys-Arg triad disrupted in antenatal Bartter syndrome*
Proc. Natl. Acad. Sci USA 96: 15298-15303, 1999

Schwalbe RA, Bianchi L, Brown AM
*Mapping the kidney potassium channel ROMK1*
J. Biol. Chem. 272, No 40: 25217-25233, 1997

Schwartz ID, Alon US
*Bartter syndrome revisited*
J. Nephrol. 9: 81-87, 1996

Schwiebert EM, Cid-Soto LP, Stafford D, Carter M, Blaisdell CJ, Zeitlin PL, Guggino WB, Cutting GR
*Analysis of ClC-2 channels as an alternative pathway for chloride conduction in cystic fibrosis airway cells*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 3879-3884, 1998

Seidel C, Reinalter SC, Seyberth HW, Schärer K
Prepubertal growth in the hyperprostaglandin E syndrome
Pediatr. Nephrol. 9: 723-728, 1995

Seyberth HW, Rascher W, Schweer H, Kühl PG, Mehls O, Schärer K
*Congenital hypokalaemia with hypercalciuria in preterm infants: A hyperprostaglandinuric tubular syndrome different from Bartter syndrome*
J. Pediatr. 107: 694-701, 1985

Seyberth HW, Königer SJ, Rascher W, Kühl PG, Schweer H
*Role of prostaglandins in hyperprostaglandin E syndrome and in selected renal tubular disorders*
Pediatr. Nephrol. 1: 491-497, 1987

Seyberth HW, Leonhardt A, Soergel M
*Das Hyperprostaglandin-$E_2$-Syndrom*
Monatsschr. Kinderheilkd. 142: 392-395, 1994

Seyberth HW, Soergel M, Köckerling A
*Hypokalaemic tubular disorders: the hyperprostaglandin E syndrome and Bartter syndrome*
In: Davison AM, Cameron JS, Grünfeld JP, Kerr DNS, Ritz E (eds); Oxford Textbook of clinical nephrology, 2. ed.
Oxford University Press, Oxford, 1085-1094, 1998

Shoemaker L, Welch TL, Bergstrom W, Abrams A, Yergey AL, Vieira N
*Calcium kinetics in the hyperprostaglandine E syndrome*
Pediatr. Res. 33: 92-96, 1993

Shuck ME, Bock JH, Benjamin CW, Tsai TD, Lee KS, Slightom JL, Bienowski MJ
*Cloning and characterization of multiple forms of the human kidney ROM-K potassium channel*
J. Biol. Chem. 269, No 39: 24261-24270, 1994

Simon DB, Nelson-Williams C, Bia MJ, Ellison D, Karet FE, Molina AM, Vaara I, Iwata F, Cushner HM, Koolen AM, Gainza FJ, Gitelman HJ, Lifton RP
*Gitelman`s variant of Bartter`s syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter*
Nature Gen. 12: 24-30, 1996a

Simon DB, Karet FE, Hamdan JH, DiPietro A, Sanjad SA, Lifton RP
*Bartter`s syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-Cl cotransporter NKCC2*
Nature Gen. 13: 183-188, 1996b

Simon DB, Karet FE, Rodriguez-Soriano J, Hamdan JH, DiPietro A, Trachtman H, Sanjad SA, Lifton RP
*Genetic heterogeneity of Bartter`s syndrome revealed by mutations in the K+ channel, ROMK*
Nature Gen. 14: 152-156, 1996c

Simon DB, Bindra RS, Mansfield TA, Nelson-Williams C, Mendonca E, Stone R, Schurman S, Nayir A, Alpay H, Bakkaloglu A, Rodriguez-Soriano J, Morales JM, Sanjad SA, Taylor CM, Pilz D, Brem A, Trachtman H, Griswold W, Richard GA, John E, Lifton RP
*Mutations in the chloride channel gene CLCNKB, cause Bartter's syndrome Typ III*
Nature Gen. 17: 171-178, 1997

Sutton RA, Mavichak V, Halabe A, Wilkins GE
*Bartter`s syndrome: Evidence suggested a distal tubular defect in a hypocalciuric variant of the syndrome*
Min. Electrolyte Metab. 18: 43-51, 1992

Syren ML, Tedeschi S, Cesareo L, Bellantuono R, Colussi G, Procaccio M, Ali A, Domenici R, Malberti F, Sprocati M, Sacco M, Miglietti N, Edefonti A, Sereni F, Casari G, Coviello DA, Bettinelli A
*Identification of fifteen novel mutations in the SLC12A3 gene encoding the Na-Cl Co-transporter in Italian patients with Gitelman syndrome*
Hum. Mutat. 20: 78, 2002

Taglialatela M, Wible BA, Caporaso R, Brown AM
*Specification of pore properties by the carboxyl terminus of inwardly rectifying $K^+$ channels*
Science 264: 844-847, 1994

Tsai TD, Shuck ME, Thompson DP, Bienkowski MJ, Lee KS
Intracellular $H^+$ inhibits a cloned rat kidney outer medulla $K^+$ channel expressed in Xenopus oocytes
Am. J. Physiol. 268: C1173-C1178, 1995

Vargas R, Antignac C, Jean G, Forestier L, Niaudet P, Feldmann D, Deschênes G, Károlyi L, Seyberth HW, Madrigal G, Hildebrandt F, Knoers N, Guay-Woodford L, Hebert SC an International Bartter Syndrome Collaborative Study Group
*Phenotypic and genetic variability in Bartter syndrome*
J. Am. Soc. Nephrol. 7: 1625 (Abstract), 1996

Waldegger S, Jentsch TJ
*Functional and structural analysis of ClC-K chloride channels involved in renal disease*
J. Biol. and Chem. 275, No 32: 24527-24533, 2000

Waldegger S, Jeck N, Barth P, Peters M, Vitzthum H, Wolf K, Kurtz A, Konrad M, Seyberth HW
*Barttin increases surface expression and changes current properties of ClC-K channels*
Europ. J. of Physiol. 444: 411-418, 2002

Wang W, Sackin H, Giebisch G
*Renal potassium channels and their regulation*
Annu. Rev. Physiolo. 54: 81-96, 1992

Wang W
*Regulation of the ROMK channel: interaction of the ROMK with associate proteins*
Am. Physiol. Soc.: F826-F831, 1999

White TJ, Anheim N, Ehrlich HA
*The polymerase chain reaction*
Trends Genet. 5: 185-189, 1989

Xu JC, Lytle C, Zhu TT, Payne JA, Benz Jr. E, Forbush III B
*Molecular cloning and functional expression of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl- cotransporter*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2201-2205, 1994

Xu ZC, Yang Y, Hebert SC
*Phosphorylation of the ATP-sensitive, inwardly rectifying $K^+$ channel, ROMK, by cyclic AMP-dependent protein kinase*
J. Biol. Chem. 271: 9313-9319, 1997

Xu JZ, Hall AE, Peterson LN, Bienkowski MJ, Eessalu TE, Hebert SC
*Localization of the ROMK protein on apical membranes of rat kidney nephron segments*
Am. J. Physiol. 273: F739-F748, 1997

Yano H, Philipson LH, Kugler JL, Tokuyama Y, Davis EM, Le Beau MM, Nelson DJ, Bell GI, Takeda J
*Alternative splicing of human inwardly rectifying $K^+$ channel ROMK1 mRNA*
Mol. Pharmacol. 45: 854-860, 1994

Zoccali C, Bartoli E, Curatola G, Maggior Q
*The renal tubular defect of Bartter`s syndrome*
Nephron 32: 140-148, 1982

# 7 Anhang

## 7.1 Fragebogen

**Fragebogen für das Bartter Syndrom**

(antenatale, klassische und Gitelman Variante)




**Fragen zur phänotypischen Charakterisierung von Patienten mit familiären hypokaliämischen Tubulopathien**

**Patient** ______________________ **geb.** ____________

**Ethnische Herkunft:** ______________ **Konsanguinität?** __________

**1. Polyhydramnion**

| | | | |
|---|---|---|---|
| vorhanden | ja ❍ | | nein ❍ |
| Ist das Vorliegen oder Nicht-Vorliegen gut dokumentiert? | ja ❍ | | nein ❍ |

**2. Frühgeburtlichkeit**

| | | | |
|---|---|---|---|
| vorhanden | ja ❍ | ________ SSW | nein ❍ |
| Existieren neben etwaig vorgelegenem Polyhydramnion andere Ursachen der Frühgeburtlichkeit, wenn ja, welche? | ja ❍ | ____________<br>____________ | nein ❍ |
| Konnte keine Ursache für die Frühgeburtlichkeit eruiert werden? | ja ❍ | | nein ❍ |

**3. Zeitpunkt der Erstmanifestation**

Zeigte der/die PatientIn bereits in der Neonatalperiode klinische Auffälligkeiten, wenn ja, welche? ja ❍ ____________________ nein ❍

In welchem Alter wurde die Diagnose gestellt? ____________________

Die Angaben zu den folgenden Kategorien 4-8 sollten bitte den Status des/der Patienten/in vor Beginn einer Indometacin-Therapie oder während einer Therapiepause widerspiegeln! Sind nur Daten unter Indometacin-Behandlung vorhanden, bitten wir Sie, dies zu kennzeichnen.

**4. Iso-/Hyposthenurie**

Geben Sie die maximal erreichte Urinkonzentration an [mosm/kg]: ________________

Unter welchen Bedingungen wurde diese Konzentration erreicht?

| Morgenurin | Durstversuch | nasaler Minirintest | i.v. Minirintest | andere |
|---|---|---|---|---|
| ❍ | ❍ | ❍ | ❍ | __________ |

Ließ sich dieses Ergebnis reproduzieren? ja ❍ nein ❍

**5. Hyperkalziurie/Hypokalziurie**

renaler Kalziumverlust pro Tag oder alternativ Kalzium/Kreatinin-Quotient (bitte unter Angabe der Dimension): ______________________________

reproduzierbar? ja ❍ nein ❍

**6. Nephrokalzinose**

vorhanden ja ❍ nein ❍

wenn *positiv*,
- Alter bei Erstdiagnose ____________________
- im Verlauf tendenziell... zunehmend ❍ abnehmend ❍
- aktueller Status leicht ❍ mittelschwer ❍ schwer ❍ nicht mehr nachweisbar ❍

**7. Hypokaliämie**

Geben Sie den niedrigst gemessenen Kaliumwert an: ____________ [mmol/l]

Wie häufig haben Sie bei dem/der Patienten/in hypokaliämische Situationen (<**3 mmol/l**) registriert (nicht berücksichtigt werden sollten hier hypokaliämische Perioden anderer Ursache, z.B. innerhalb einer GE)?

regelmäßig ❍ häufig ❍ selten ❍ einmal ❍ nie ❍

**8. Hypomagnesiämie**

Setzen Sie den niedrigst gemessenen $Mg^{2+}$-Wert ein: ________________ [Dimension]

Ließ sich dieses Ergebnis reproduzieren? ja ❍ nein ❍

Wir bedanken uns für Ihre freundlichen Bemühungen!

## 7.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Bertalanffy, Bien, Cetin, Christiansen, Daut, Doss, Engel, Feuser, Fuhrmann, Gemsa, Geus, Göke, Gotzen, Gressner, Griss, Gröne, Grundner, Habermehl, Happle, Hellinger, Hesse, Hofmann, Hoffmann, Kaffarnik, Kälble, Kern, Klenk, Klose, Koolmann, Kretschmer, Krieg, Kroll, Lang, Lange, Lennartz, Lorenz, Maisch, Moosdorf, Oertel, Pfab, Pohlen, Radsak, Reichert, Remschmidt, Röhm, Rothmund, Schachtschabel, Schäfer, Schulz, Schwarz, Seyberth, Slenczka, Sturm, Vohland, Voigt, Weihe, Werner, Westermann, Wichert von, Wulff

Meine akademischen Lehrer in Bremen waren die Damen und Herren

Albrecht, Arnold, Bahmer, Boos, Bremerich, Chilla, Freyschmidt, Hahn, Huppertz, Kamp, Klempa, Kolb, Lison, Lorenz, Neubauer, Rasche, Schröder, Staar, Voßmann

## 7.3 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. H.W. Seyberth ganz herzlich für die Überlassung des Themas und für sein Vertrauen in eine sachgerechte Umsetzung.

Mein besonderer Dank gilt ferner Herrn Dr. med. M. Konrad und Herrn Dr. med. N. Jeck für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, die Geduld und Unterstützung, die bei der Umsetzung dieser Arbeit notwendig waren, sowie für die stetige Diskussionsbereitschaft und freundliche Aufnahme in der Arbeitsgruppe.

Auch allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Seyberth gebührt mein Dank für die tatkräftige Unterstützung insbesondere beim Auftreten von experimentellen, technischen und theoretischen Schwierigkeiten.

Erwähnt seien auch alle Mitarbeiter der beteiligten Zentren in Nijmegen/Niederlande, Paris/Frankreich und Freiburg/Deutschland, die mit der Sammlung von Patienten, der Aufarbeitung und Bereitstellung der Patienten-DNA tatkräftig unterstützt haben.

Ferner bedanke ich mich bei meinen Eltern, meinem Bruder, meiner Lebensgefährtin und den vielen Freunden und Bekannten, die mich je in spezifischer Weise bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.

## Die vorliegende Arbeit wurde in Teilen in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

Jeck N, Derst C, Wischmeyer E, Ott H, Weber S, Rudin C, Seyberth HW, Daut J, Karschin A, Konrad M
*Functional heterogeneity of ROMK mutations linked to hyperprostaglandin E syndrome*
Kidney Intern. 59: 1803-1811, 2001b

Schulte U, Hahn H, Konrad M, Jeck N, Derst C, Wild K, Weidemann S, Ruppersberg JP, Fakler B, Ludwig J
*pH gating of ROMK ($K_{ir}$ 1.1) channels: Control by an Arg-Lys-Arg triad disrupted in antenatal Bartter syndrome*
Proc. Natl. Acad. Sci USA 96: 15298-15303, 1999